

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MINAS GERAIS
UNIDADE FRUTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

EFEITO DE BIOCARVÕES PRODUZIDOS A PARTIR DO
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O METABOLOMA
DE PLÂNTULAS DE SOJA (*Glycine max* L.)

Nathalia Eugênia Silva
Bióloga

FRUTAL-MG
2024

Nathalia Eugênia Silva

**EFEITO DE BIOCARVÕES PRODUZIDOS A PARTIR DO
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O METABOLOMA
DE PLÂNTULAS DE SOJA (*Glycine max* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Acadêmica de Frutal, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Dr. Alan Rodrigues Teixeira Machado

Coorientadora:

Dra. Osania Emerenciano Ferreira

**FRUTAL–MG
2024**

Silva, Nathalia Eugênia.

Efeito de biocarvões produzidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar sobre o metaboloma de plântulas de soja (*Glycine max* L.). / Nathalia Eugênia Silva. - Frutal, MG, 2024.

61 f.: il.

Orientador: Alan Rodrigues Teixeira Machado, Dr.

Co-orientadora: Osania Emerenciano Ferreira, Dra.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Estado de Minas Gerais, Frutal, MG, 2024.

1. Biomassa. 2. Pirólise. 3. Germinação. 4. Fitotoxicidade. 5. Metabolismo I. Machado, Alan Rodrigues Teixeira, orient. II. Ferreira, Osania Emerenciano, co-orient. III. Título.

CDU 631.4

Catálogo na fonte



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS

Ata

NATHALIA EUGÊNIA SILVA

EFEITO DE BIOCARVÕES PRODUZIDOS A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O METABOLOMA DE PLÂNTULAS DE SOJA (*Glycine Max* L.)

Dissertação apresentada a Universidade do Estado de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, na área de concentração Ciências Ambientais, Linha de Pesquisa Tecnologia, Ambiente e Sociedade, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 25 de março de 2024

Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo - UNESP - Jaboticabal -SP

Prof^ª. Dr^ª. Elisângela Aparecida da Silva - UEMG - Frutal-MG

PROF. DR. ALAN RODRIGUES TEIXEIRA MACHADO

ORIENTADOR



Documento assinado eletronicamente por **Alan Rodrigues Teixeira Machado, Professor de Educação Superior**, em 25/03/2024, às 20:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Osania Emerenciano Ferreira, Professora de Educação Superior**, em 26/03/2024, às 07:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisangela Aparecida da Silva, Professora de Educação Superior**, em 27/03/2024, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Everlon Cid Rigobelo, Usuário Externo**, em 08/04/2024, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **84832506** e o código CRC **279432CA**.

AGRADECIMENTOS

Ao escrever estas palavras, sinto uma imensa gratidão invadir o meu coração. É com muito carinho e emoção que dedicarei este espaço aos queridos Alan Rodrigues Teixeira Machado e Osania Emerenciano Ferreira, meus orientadores de mestrado.

Alan, desde o nosso primeiro contato, pude perceber a sua dedicação e comprometimento com o meu desenvolvimento acadêmico. Suas orientações precisas e incansáveis buscavam sempre o meu melhor. Agradeço por cada conversa esclarecedora, pela paciência em me explicar o funcionamento de todos os equipamentos, os quais eram algo novo para mim e fora da minha zona de conforto, por estar sempre disponível para tirar as minhas dúvidas e por todo o seu apoio ao longo dessa jornada.

Osania, minha coorientadora amada, o seu cuidado e atenção fizeram toda a diferença para que eu não desistisse nos momentos mais difíceis. Sua presença constante me trouxe confiança, e ter você ao meu lado nos desafios enfrentados no laboratório foi uma verdadeira bênção. Nunca esquecerei o dia em que abriu as portas da sua própria casa para me auxiliar na compreensão do sistema de estatística, quando eu ainda nem sabia do que se tratava e nem imaginava o que me aguardava pela frente. Sua parceria no estágio docência foi além do profissionalismo, pois aprendi muito com você.

Meus sinceros agradecimentos a ambos, queridos orientadores, por toda a paciência e dedicação demonstradas ao longo desse período. Vocês foram mais do que mestres para mim, foram alicerces em uma caminhada.

Família, o meu porto seguro. Pai Mauro, mãe Orni, meu amado filho Kauã, irmã Nayara, cunhado Yan e sobrinhos Manuella, Murilo e Mariah, a vocês dedico um agradecimento especial. Vocês acreditaram em mim quando eu mesmo duvidava, encorajaram a minha jornada acadêmica e estiveram presentes em cada passo importante. É inestimável o valor desse suporte que compartilhamos juntos. Sem o apoio e incentivo de vocês, com certeza, os desafios seriam muito maiores. Nesse mar de aprendizados e descobertas, fui abençoada por ter esse círculo familiar. Agradeço por estarem sempre ao meu lado, torcendo por mim, enxugando as lágrimas das derrotas e compartilhando a alegria das conquistas.

Aos docentes, meu sincero agradecimento por compartilharem seus conhecimentos com sabedoria e carinho. Cada ensinamento foi valioso para minha formação.

Agradeço também aos discentes, que desempenharam um papel importante em minha trajetória. Nossa parceria e colaboração foram essenciais.

À equipe do laboratório, Adriana, Arthur e Fernanda, meu agradecimento por toda ajuda e suporte durante o meu projeto. Vocês foram incríveis.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a Deus, por me proporcionar essa oportunidade de me tornar mestre. Nenhum obstáculo foi capaz de me deter, pois a força que encontrei em cada um aqui mencionado, foi fundamental para esta conquista.

RESUMO

O biocarvão tem demonstrado efeitos variados sobre a germinação de sementes, de acordo com a matéria-prima, método de preparação e dose aplicada. No entanto, os mecanismos que explicam essa variação ainda não foram completamente elucidados. Para avançar na compreensão desses mecanismos, avaliou-se o efeito de amostras de biocarvão feito do bagaço de cana-de-açúcar sob temperaturas de pirólise de 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600). O rendimento gravimétrico, a condutividade elétrica (CE) e o pH foram avaliados. A morfologia e composição elementar foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura acoplado a um detector de Energia Dispersiva de Raios X, enquanto os grupos funcionais foram analisados usando Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier. A estabilidade térmica do biocarvão foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA). Os ensaios com soja foram conduzidos usando como substrato areia e areia contendo biocarvão, nas doses de 0, 1, 3 e 5% m/m. Após 8 dias da semeadura foram avaliadas a Germinação Relativa (GR), o Crescimento Médio Relativo da Radícula (CRR), o Índice de Germinação (IG), a Biomassa Seca (BS) e a atividade da α -amilase. Para avaliação do metaboloma, a BS foi submetida à extração com mistura de metanol- d_4 e D₂O (1:1 v/v). Os extratos foram submetidos à análise metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H). O aumento da temperatura de pirólise de 300 °C para 600 °C promoveu aumento no teor de carbono, pH, CE, minerais (K e P) e na estabilidade térmica, enquanto o teor de oxigênio, grupos funcionais e o rendimento gravimétrico foram reduzidos. Os valores de GR, CRR, e IG aumentaram em todos os tratamentos em relação ao controle. No entanto, esses parâmetros aumentaram linearmente e positivamente com o aumento da dose apenas para o tratamento com BBM300. Por outro lado, a BS aumentou em todos os tratamentos, exceto para BBM300, nas doses de 1 e 3% m/m. O ensaio com a α -amilase indicou que tanto a temperatura de pirólise quanto a dose do biocarvão exercem influência sobre a atividade da enzima, sendo observado que a amostra BBM400 a 3% m/m potencializou a maior atividade enzimática. Nove metabólitos (alanina, asparagina, ácido acético, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido succínico, glicerol e sacarose) foram identificados nos extratos da BS como os mais influentes para a separação dos tratamentos. Com isso, descobriu-se cinco vias do metabolismo da germinação de soja que foram impactadas significativamente. São as vias do ciclo do ácido cítrico, dos metabolismos da tirosina, amido e sacarose, piruvato e enxofre. Em conjunto esses resultados mostraram que os biocarvões aceleraram o catabolismo de triacilglicerídeos para sacarose, com efeito mais pronunciado nas maiores doses.

Palavras-chave: Biomassa; Pirólise; Germinação; Fitotoxicidade; Metabolismo.

EFFECT OF BIOCHARS PRODUCED FROM SUGARCANE BAGASSE ON THE METABOLOME OF SOYBEAN SEEDLINGS (*Glycine max* L.)

ABSTRACT

Biochar has shown varied effects on seed germination, depending on the feedstock, preparation method, and applied dose. However, the mechanisms explaining this variation have not been fully elucidated. To advance in the understanding of these mechanisms, the effect of biochar samples made from sugarcane bagasse at pyrolysis temperatures of 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400), and 600 °C (BBM600) was evaluated. Gravimetric yield, electrical conductivity (EC), and pH were assessed. Morphology and elemental composition were analyzed using a Scanning Electron Microscope coupled with an Energy Dispersive X-ray detector, while functional groups were analyzed using Fourier Transform Infrared Spectrometer. The thermal stability of biochar was evaluated by Thermogravimetric Analysis (TGA). Soybean assays were conducted using sand as substrate with and without biochar, at doses of 0, 1, 3, and 5% w/w. After 8 days of sowing, Relative Germination (RG), Relative Average Radicle Growth (RRAG) and Germination Index (GI), Dry Biomass (DB), and α -amylase activity were evaluated. For metabolome evaluation, DB was extracted with a mixture of methanol- d_4 and D₂O (1:1 v/v). The extracts were subjected to metabolomic analysis by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR). Increasing the pyrolysis temperature from 300 °C to 600 °C promoted an increase in carbon content, pH, EC, minerals (K and P), and thermal stability, while oxygen content, functional groups, and gravimetric yield were reduced. RG, RRAG, and GI values increased in all treatments compared to the control. However, these parameters increased linearly and positively with increasing dose only for the BBM300 treatment. On the other hand, DB increased in all treatments except for BBM300 at doses of 1 and 3% w/w. The α -amylase assay indicated that both pyrolysis temperature and biochar dose influence enzyme activity, with BBM400 at 3% w/w showing the highest enzymatic activity. Nine metabolites (alanine, asparagine, acetic acid, citric acid, formic acid, fumaric acid, succinic acid, glycerol, and sucrose) were identified in DB extracts as the most influential for treatment separation. As a result, five soybean germination metabolism pathways were significantly impacted, including the citric acid cycle, tyrosine metabolism, starch and sucrose metabolism, pyruvate metabolism, and sulfur metabolism. Altogether, these results showed that biochars accelerated the catabolism of triacylglycerides to sucrose, with a more pronounced effect at higher doses.

Keywords: Biomass; Pyrolysis; Germination; Phytotoxicity; Metabolism.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Biocarvão.....	17
2.2. Biocarvão do bagaço de cana-de-açúcar	18
2.3. Efeitos do biocarvão sobre as propriedades do solo.....	19
2.4. Soja (<i>Glycine max</i> L.).....	20
2.5. Metabólitos envolvidos durante a germinação da soja.....	22
2.6. Metabolômica	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Coleta, preparação do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e local de estudo	25
3.2. Preparação do biocarvão a partir do bagaço de cana-de-açúcar.....	25
3.3. Caracterização das propriedades físico-químicas das amostras de biocarvão.....	25
3.3.1. Determinação do pH e da condutividade elétrica.....	25
3.3.2. Caracterização morfológica e elemental	26
3.3.3. Análise dos grupos funcionais.....	26
3.3.4. Análise térmica	26
3.4. Ensaio de germinação de sementes de soja.....	27
3.4.1. Análises fisiológicas e do estado nutricional de plântulas de soja	28
3.5. Análise metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	28
3.6. Análise estatística e quimiométrica dos dados	29
3.7. Análise de vias metabólicas.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Produção e caracterização das amostras de biocarvão	31
4.2. Efeito do biocarvão sobre a germinação de soja	35
4.3. Composição dos extratos de plântulas de soja.....	38
4.5. Efeito do biocarvão sobre as vias metabólicas	43
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Espectros de Infravermelho para as amostras de biocarvão obtidas do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600).
.....32
- Figura 2** – Curvas termogravimétricas para as amostras de biocarvão obtidas do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600).
.....33
- Figura 3** – Micrografias eletrônicas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com detecção por elétrons secundários do (a) bagaço de cana-de-açúcar, com ampliação de 1000 vezes, (b) BBM300, (c) BBM400 e (d) BBM600, com ampliações de 500 vezes.....34
- Figura 4** – (a) Germinação Relativa (GR, %), (b) Crescimento Médio Relativo da Radícula (CRR, %), (c) Índice de Germinação (IG, %) e (d) biomassa seca (BS, g) de plântulas de soja cultivadas, por 8 dias, em areia com diferentes doses do biocarvão obtido do bagaço de cana-de-açúcar a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600). Barras seguidas de mesma letra minúscula indicam que as médias não diferem dentro de cada tratamento e as seguidas de mesma letra maiúscula indicam que as médias dos tratamentos não diferem com a temperatura de pirólise pelo teste Scott-Knott a 5%. Os valores médios para GR, CRR e IG do controle (0% de biocarvão) foram de 100% Aa e para BS foi de 2,68 g Aa.....35
- Figura 5** - Atividade da α -amilase de plântulas de soja cultivadas, por 8 dias, em areia com diferentes doses do biocarvão obtido do bagaço de cana-de-açúcar a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600).37
- Figura 6** - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de biomassa de plântulas de soja cultivadas em areia (controle) e areia contendo biocarvão pirolisado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 0, 1, 3 e 5% m/m.39
- Figura 7** – Gráfico dos valores de $-\log(p\text{-valor})$ obtido a partir da análise de variância simples. Os bins significativos são apresentados em vermelho ($n = 94$) e os não significativos em verde ($n = 139$).40
- Figura 8** – Gráfico de escores da componente 1 versus componente 2 da Análise de Componentes Principais (PCA) dos extratos das plântulas de soja cultivadas em areia (controle) e em areia com biocarvão pirolisado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 1, 3 e 5% m/m. As elipses ao redor das amostras foram traçadas com 95% de confiança.....41
- Figura 9** – Gráfico de pesos da componente 1 da Análise de Componentes Principais (PCA) dos extratos das plântulas de soja germinadas em areia (controle) e em areia com biocarvão pirolisado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 0, 1, 3 e 5% m/m. As elipses ao redor das amostras foram traçadas com 95% de confiança grupo. 1) ácidos graxos; 2) alanina; 3) ácido acético; 4)

ácido succínico; 5) ácido cítrico; 6) asparagina; 7) glicerol; 8) sacarose; 9) ácido fumárico; 10) derivados de isoflavonas; 11) ácido fórmico.42

Figura 10 – Dendograma do HCA associado ao mapa de calor dos compostos quantificados nos extratos das plântulas de soja cultivadas em areia (controle) e em areia com biocarvão pirolisado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 0, 1, 3 e 5% m/m. A cor de cada mudança de seção de azul escuro a carmesim no mapa de calor corresponde a uma mudança de baixo para alto para cada concentração de metabólito.43

Figura 11 – Gráfico de impacto das vias metabólicas identificadas a partir da alteração significativa de nove metabólitos quantificados nos extratos das plântulas de soja. (a) Controle versus BBM300 (nas doses de 1 e 3% m/m), BBM400 e BBM600 (nas doses de 1% m/m). (b) Controle versus BBM300 (na dose de 5% m/m), BBM400 (nas doses de 3 e 5% m/m) e BBM600 (nas doses de 3 e 5% m/m). A cor dos círculos é classificada de acordo com o p-valor e o tamanho revelam o impacto na via. Apenas as 5 vias metabólicas com $p < 0,05$ e impacto $> 0,05$ foram destacadas. São elas: 1) Ciclo do ácido cítrico; 2) Metabolismo da tirosina; 3) Metabolismo de amido e sacarose; 4) Metabolismo do piruvato e 5) Metabolismo de enxofre.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento gravimétrico e características químicas de amostras de biocarvão preparadas a partir do bagaço de cana-de-açúcar (BCA).....	31
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BCA - Bagaço de cana-de-açúcar

CE – Condutividade Elétrica

CRR - Crescimento Médio Relativo da Radícula

GR - Germinação Relativa

IG - Índice de Germinação

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

R% - Rendimento gravimétrico em porcentagem

BBM300 – Biocarvão do bagaço de cana-de-açúcar preparado em forno tipo mufla a 300 °C

BBM400 – Biocarvão do bagaço de cana-de-açúcar preparado em forno tipo mufla a 400 °C

BBM600 – Biocarvão do bagaço de cana-de-açúcar preparado em forno tipo mufla a 600 °C

1. INTRODUÇÃO GERAL

A germinação é a primeira fase do ciclo vegetativo, sendo importante o seu bom desempenho para alcançar alta produtividade (Liu *et al.*, 2023). Dessa forma, a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas são fatores fundamentais que determinam a produção de alimentos necessárias à sobrevivência humana (Fajinmi *et al.*, 2021). Esse complexo processo metabólico é regulado por uma série de interferentes endógenos e/ou exógenos (Ma *et al.*, 2022a). O substrato, por exemplo, tem forte influência sobre a germinação, pois parâmetros como a capacidade de retenção de água (Ramírez-Tobías *et al.*, 2014; Leroy *et al.*, 2016), a aeração (Nautiyal *et al.*, 2023), a disponibilidade de nutrientes (Geilfus, 2019; Olmo *et al.*, 2015), a estrutura (Rocha *et al.*, 2020), entre outros, podem variar conforme o tipo de material. Neste contexto, o biocarvão tem sido combinado com vários substratos para melhorar a germinação e o crescimento de plantas (Zhu *et al.*, 2018; Ravindran *et al.*, 2019; Racioppi *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2021; Rathnayake *et al.*, 2021).

As pesquisas também demonstraram que alguns compostos adsorvidos no biocarvão durante a sua produção podem ser lixiviados para o solo ou substrato, o que pode causar riscos de toxicidade para as plantas, microrganismos e invertebrados (Gezahegn *et al.*, 2021). Para compreender possíveis efeitos ecotoxicológicos do biocarvão, diversas pesquisas foram realizadas, principalmente, sobre a germinação e o crescimento de espécies vegetais (Rogovska *et al.*, 2012; Solaiman *et al.*, 2012; Gascó *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2020; Das *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2023). Assim, efeitos fitotóxicos de diferentes amostras de biocarvão foram encontrados, por exemplo, para trevo-branco (*Trifolium repens*) (Gale *et al.*, 2016), alface (*Lactuca sativa*) (Oh *et al.*, 2012), Spirulina (*Arthrospira platensis*) (Silva *et al.*, 2020) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (Li *et al.*, 2015; Martínez-Gómez *et al.*, 2023).

Em contraste com esses exemplos, Gezahegn *et al.* (2021) demonstraram que os lixiviados de biocarvões obtidos a partir da pirólise lenta de diferentes tipos de madeira promoveram o crescimento das radículas de alface e rabanete (*Raphanus sativus*). Uma conclusão similar foi alcançada por Lou *et al.* (2016) que demonstraram que os lixiviados de biocarvão de palhas de trigo e milho aumentaram o rendimento de repolho chinês (*Brassica rapa*). Outros exemplos de efeitos positivos foram registrados para os lixiviados de biocarvões

obtidos a partir da casca do coco (*Cocos nucifera*) e plantas de milho (*Zea mays* L.), melhoraram as germinações de milho e rabanete (Sujeeun; Thomas, 2017).

Os exemplos apresentados acima mostraram que as plantas têm reações diferentes ao biocarvão, logo, diversas propostas de mecanismos foram apresentadas para explicar esses efeitos na germinação e no desenvolvimento das plântulas. Os principais fatores reguladores estão relacionados à liberação de fitotoxinas na solução do substrato, além da alteração na porosidade e capacidade de retenção de água (Joseph *et al.*, 2021; Murtaza *et al.*, 2023). De fato, o biocarvão de colmo de milho (*Zea mays* L.) e de camará (*Lantana camara*), quando aplicados em taxas elevadas, tiveram efeitos inibitórios na germinação e no desenvolvimento de plântulas de milho e grama-preta, devido à presença de metais tóxicos (Das *et al.*, 2022). A causa dos efeitos inibitórios de nanopartículas de biocarvão sobre a germinação de sementes foram associadas aos compostos fenólicos e ao bloqueio nas aberturas epidérmicas, o que reduziu a transferência de nutrientes e água (Zhang *et al.*, 2020). Com a adição de altas doses de biocarvão, o N disponível no solo e a biomassa de *Robinia pseudoacacia* L. reduziram, enquanto em doses menores houve o aumento, devido à melhoria da capacidade de retenção de água e aumento do P disponível no solo (Bu *et al.*, 2020). French e Pascuzzi (2018) propuseram que o biocarvão estimula o crescimento de genótipos de tomate por estímulos da via giberelina.

Mesmo que todas essas propostas sejam importantes para compreender as interações biocarvão-planta, os mecanismos moleculares que regulam a germinação ainda são pouco conhecidos. A análise do efeito do biocarvão sobre os processos metabólicos durante o desenvolvimento das plântulas contribuirá para compreensão dos mecanismos complexos associados à interação planta-biocarvão (Weng *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2021). Para tanto, a abordagem metabolômica apresenta-se como ferramenta analítica promissora para investigação desses mecanismos (Sun *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2022). Ela refere-se, mais especificamente, à identificação e quantificação sistemática dos produtos do metabolismo constituídos de moléculas de baixa massa molar num sistema biológico e em um período específico. De fato, plantas de milho cultivadas em solo condicionado com biocarvão apresentaram mudanças no perfil metabólico, incluindo alterações no metabolismo de açúcares e aminoácidos (Sun *et al.*, 2017). Análise metabolômica revelou também que a aplicação de biocarvão pode aumentar a produção de carboidratos, flavonoides e glucosinolatos em repolho chinês pak choi (*Brassica rapa* L.) (Song *et al.*, 2020). No entanto, até onde sabemos, existem

poucos estudos que aplicam a metabolômica para avaliar os efeitos do biocarvão na germinação de sementes.

Portanto, para preencher essa lacuna de conhecimento, este estudo teve como objetivo identificar: (i) os efeitos do biocarvão na germinação e no desenvolvimento de plântulas das sementes de soja; e (ii) as variações no metaboloma de plântulas de soja, germinadas em substrato de areia com biocarvão. A soja foi escolhida como modelo experimental devido à sua sensibilidade a fatores ambientais, tais como temperatura (Gong *et al.*, 2021), estresse hídrico (Nasielski *et al.*, 2015), nutrição do solo (Singh *et al.*, 2018) e resposta a substâncias tóxicas e salinidade (Maftu'ah *et al.*, 2023).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Biocarvão

O biocarvão, um material carbonáceo obtido pela decomposição térmica de biomassa como resíduos agrícolas, florestais e urbanos em condições limitadas de oxigênio, é reconhecido por sua porosidade que favorece a adsorção e retenção de nutrientes, melhorando os atributos físico, químico e biológico do solo. A aplicação desse produto também é destacada por sua contribuição na mitigação de gases de efeito estufa e na remediação de solos contaminados (Hagemann *et al.*, 2018; Sri Shalini *et al.*, 2020; GLASER *et al.*, 2002; Mckenna *et al.*, 2021).

O biocarvão possui densidade energética comparável à do carvão mineral, mas com a vantagem de um menor teor de enxofre e menores emissões de gases de efeito estufa, uma vez que a pirólise transforma o carbono da biomassa em uma forma de carbono estável (Yang *et al.*, 2017; Fidel *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2023). De fato, Xu *et al.* (2021) apontam que o uso do biocarvão pode reduzir as emissões de CO₂, o que traz benefícios sustentáveis.

Na agricultura, o biocarvão melhora a capacidade de retenção de água, aeração e disponibilidade de nutrientes, aumentando a produtividade das plantas, reduzindo a erosão e o uso de fertilizantes sintéticos (Fidel *et al.*, 2019). Sua eficácia também se estende à remediação de solos contaminados por metais tóxicos, adsorvendo e imobilizando tais metais, reduzindo contaminação de águas subterrâneas e plantações (Souza *et al.*, 2022; Qiu *et al.*, 2021).

O potencial do biocarvão como substrato para a produção de biofertilizantes e biopesticidas é uma alternativa sustentável aos produtos químicos tradicionais, promovendo o crescimento de microrganismos benéficos como bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrizos (Liao *et al.*, 2016; Gujre *et al.*, 2021).

Além dos benefícios ambientais, a produção de biocarvão oferece vantagens socioeconômicas, como o aumento do emprego local, a elevação da renda dos agricultores e a melhoria do bem-estar das comunidades rurais. Contudo, a produção deve ser sustentável e responsável, respeitando a biodiversidade e os ecossistemas, assim como as comunidades tradicionais (You *et al.*, 2022).

As biomassas de origem agrícola como cascas de arroz e palha de trigo são comumente transformadas em biocarvão por meio de tratamento térmico em ambientes com limitação de oxigênio, um método tradicional e eficaz de aproveitamento desses materiais (Tripathi *et al.*, 2016). Os resíduos de madeira, uma das fontes mais antigas para a produção de biocarvão, junto com resíduos florestais como galhos e folhas, podem ser convertidos em biocarvão de alta qualidade (Trazzi *et al.*, 2018).

Os resíduos urbanos, incluindo sobras de alimentos e papelão, assim como lodo de esgoto, também têm sido utilizados para produzir esse bioproduto. Neste último, o lodo é primeiramente digerido anaerobicamente, gerando biofertilizante e um resíduo sólido que serve como insumo para a produção de biocarvão (Sharholy *et al.*, 2008; Ihsanullah *et al.*, 2022).

No contexto brasileiro, a grande produção de cana-de-açúcar representa uma fonte abundante de subprodutos e resíduos que podem ser empregados na produção de biocarvão (Mahamud; Anannya, 2021). O biocarvão se destaca por sua versatilidade, encontrando aplicações em áreas diversas como agricultura, indústria, geração de energia e gestão ambiental. Além disso, sua produção a partir de resíduos orgânicos constitui uma estratégia sustentável de gestão de resíduos, contribuindo para a preservação ambiental.

2.2. Biocarvão do bagaço de cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar é uma das principais atividades agrícolas, produzindo cerca de 1,6 bilhão de toneladas anualmente, com o Brasil sendo o líder mundial, contribuindo com aproximadamente 677 milhões de toneladas na safra 2023/2024 (CONAB, 2023). Embora a produção de açúcar e etanol seja o destino principal dessa cultura, ela também resulta na geração de uma quantidade significativa de bagaço de cana-de-açúcar (BCA), um subproduto fibroso remanescente após a extração do caldo.

O BCA é amplamente utilizado como fonte de energia renovável para produção de calor e eletricidade, destacando-se pela sua capacidade de geração de energia limpa (Xu *et al.*, 2019; Dombinov *et al.*, 2022; Azmin; Hayat; Nor, 2020). Além de sua função energética, o bagaço é utilizado na fabricação de papel, celulose e materiais de construção, contribuindo para uma economia circular e minimizando o desperdício (Mahmud; Anannya, 2021).

No Brasil, o bagaço representa uma quantidade substancial de subproduto, com estimativas apontando que cada tonelada de cana processada produz entre 260 e 280 kg de BCA (Joppert *et al.*, 2017). Sua disponibilidade estende-se além das fronteiras nacionais, sendo facilmente encontrada em outras regiões tropicais do mundo (Lebre *et al.*, 2022). O excedente de BCA tem potencial para ser transformado em produtos de alto valor agregado, como biocarvão (Iwuozor *et al.*, 2022), bem como em furfural (Catrinck *et al.*, 2020), bio-óleo (Fardhyanti *et al.*, 2022) e celulose (Mahmud; Anannya, 2021).

A compreensão das propriedades físicas e químicas do biocarvão é fundamental para ampliar sua aplicabilidade. No entanto, informações sobre como a temperatura de pirólise influencia essas propriedades no biocarvão derivado do BCA ainda são limitadas (Iwuozor *et al.*, 2022). O biocarvão do BCA não atua apenas como condicionador de solo, melhorando suas propriedades físicas, químicas e biológicas, mas também tem potencial fertilizante devido ao seu conteúdo de nutrientes essenciais como fósforo, potássio e cálcio (FAO, 2021).

A aplicação do biocarvão do BCA tem se mostrado benéfica em solos ácidos, onde melhora a retenção de água, aumenta os nutrientes e favorece o crescimento das plantas (Grutmacher *et al.*, 2018). Do ponto de vista ambiental, o biocarvão do BCA tem um papel na mitigação das emissões de gases de efeito estufa (Cha *et al.* 2016; Ding *et al.* 2016; Ahmed *et al.* 2017; Martinez-Hernandez *et al.*, 2017), e sua produção contribui para a redução da queima de bagaço em campo, infelizmente, uma prática ainda comum na indústria sucroalcooleira em várias regiões do mundo (Grutmacher *et al.*, 2018; Lebre *Et al.*, 2022; Fardhyanti *et al.*, 2022).

O biocarvão do BCA também é empregado na cogeração de energia, como um combustível sólido eficiente para produção de eletricidade e calor (Iwuozor *et al.*, 2022). Adicionalmente, esse material tem sido aplicado na remoção de poluentes, como metais pesados de soluções aquosas (Sharholy *et al.*, 2008; Ihsanullah *et al.*, 2022), e como componente para materiais de construção sustentáveis, devido às suas propriedades mecânicas apropriadas (Zeidabadi *et al.*, 2018).

2.3. Efeitos do biocarvão sobre as propriedades do solo

O biocarvão tem emergido como uma estratégia valiosa na manutenção da fertilidade do solo e representa uma alternativa sustentável aos fertilizantes e pesticidas. Ele é cada vez mais reconhecido por seu papel no revestimento de sementes, uma prática que tem mostrado resultados promissores na germinação e no desenvolvimento inicial das plântulas (Madsen *et al.*, 2016). O uso do biocarvão como condicionante do solo tem se mostrado eficaz para estimular o crescimento das plantas (Das; Ghosh; Avasthe, 2020a), aumentando a produtividade e melhorando as características do solo, como a retenção de água e de nutrientes, além da capacidade de troca catiônica (Solaiman *et al.*, 2012; Gabhane *et al.*, 2020).

A incorporação de biocarvão no solo também influencia a mineralização da matéria orgânica, afetando a disponibilidade de nutrientes essenciais, como o nitrogênio (Steiner *et al.*, 2008; Manzoni *et al.*, 2008). O ajuste do pH do solo é outro benefício do biocarvão, particularmente útil em solos ácidos, onde pode elevar o pH para níveis mais alcalinos e alterar a capacidade de troca de cátions, especialmente quando aplicado em maiores quantidades (Ogawa, 1994).

As propriedades do biocarvão e seu efeito no solo variam de acordo com o tipo e a quantidade aplicada, além das características intrínsecas do solo, como o teor de carbono orgânico, o pH e a capacidade de troca catiônica (Solaiman *et al.*, 2012). De fato, inúmeros estudos que examinam o impacto de diferentes de biocarvão no desenvolvimento das plantas, indicam que os efeitos podem ser estimulantes ou inibitórios, variando conforme a espécie vegetal (Yamato *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008; Deenik *et al.*, 2010). Embora esses estudos se concentrem principalmente em espécies já estabelecidas, como plântulas, observa-se uma lacuna de conhecimento em estágios iniciais de desenvolvimento vegetal e a necessidade de pesquisas adicionais com diferentes culturas (Ma *et al.*, 2022a).

2.4. Soja (*Glycine max* L.)

A soja (*Glycine max* L.) é uma planta pertencente à família das leguminosas, originária da Ásia, é uma cultura agrícola de importância global. Trata-se de uma importante fonte de proteína vegetal utilizada para alimentação humana e animal, além de ser matéria-prima para a produção de grande variedade de produtos e subprodutos. A cultura da soja tem uma forte presença nos campos produtivos com uma produção de aproximadamente 356 milhões de

toneladas a nível global, e especialmente no Brasil com produção de cerca de 124 milhões de toneladas e uma área plantada de 40,9 milhões de hectares (EMBRAPA, 2023). Assim, é uma das mais exploradas no Brasil e, frequentemente, é cultivada em rotação com a cana-de-açúcar (Dombinov *et al.*, 2022).

A soja foi selecionada como modelo experimental nesta pesquisa, uma vez que é uma planta sensível a vários fatores ambientais, o que a torna ideal para estudos que objetivam compreender a interação entre as plantas e ambiente. Neste sentido, um dos principais fatores que afetam o desenvolvimento da soja é a temperatura. Gong *et al.* (2021) destacam que a soja é particularmente sensível a variações de temperatura, que podem afetar tanto a fase de germinação quanto o crescimento e a maturação da planta. Isso significa que mudanças no clima, especialmente aquelas relacionadas ao aquecimento global, podem ter impactos significativos na produção de soja, alterando os ciclos de crescimento e afetando a produtividade.

Outro ponto importante é o estresse hídrico, que é a condição de escassez de água disponível para as plantas. Nasielski *et al.* (2015) demonstraram que a soja é particularmente afetada a esse tipo de estresse, que pode ocorrer devido a períodos de seca ou práticas inadequadas de irrigação. O estresse hídrico não apenas reduz o crescimento e o rendimento das plantas, mas também pode afetar a qualidade dos grãos de soja. Por isso, a gestão eficiente da água é essencial para manter a saúde e a produtividade das lavouras de soja, especialmente em regiões propensas a secas ou com recursos hídricos limitados.

A nutrição do solo é outro fator importante para o desenvolvimento saudável da soja. Singh *et al.* (2018) apontam que a soja responde de maneira significativa à qualidade e à composição nutricional do solo. A disponibilidade de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fósforo e potássio, é fundamental para o crescimento da soja, influenciando diretamente a sua produtividade. Além disso, a soja, sendo uma leguminosa, possui a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico por meio de uma simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, o que destaca a importância de um solo saudável e bem equilibrado para otimizar esse processo.

A resposta da soja a substâncias tóxicas e à salinidade também é um aspecto importante em estudos agronômicos. Maftu'ah *et al.* (2023) investigaram a resposta da soja a ambientes com alta salinidade e presença de substâncias tóxicas. Esses fatores podem afetar adversamente o crescimento da soja, limitando a absorção de água e nutrientes pelas raízes e causando desequilíbrios fisiológicos. Esse conhecimento é especialmente relevante em áreas onde a

irrigação intensiva ou o uso inadequado de fertilizantes aumentam a salinidade do solo, afetando negativamente as lavouras de soja.

Considerando a sensibilidade da soja a diversos fatores ambientais, ela se estabelece como um modelo experimental útil, particularmente para avaliar os efeitos do biocarvão. A capacidade da soja de responder de maneira significativa a variáveis como temperatura, estresse hídrico, nutrição do solo e exposição a substâncias tóxicas a torna ideal para investigar como o biocarvão pode influenciar essas interações. A pesquisa sobre a interação entre a soja e o biocarvão tem o potencial de fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes, contribuindo para uma produção agrícola mais resiliente e adaptada aos desafios ambientais contemporâneos.

2.5. Metabólitos envolvidos durante a germinação da soja

As plantas, durante seu ciclo de vida, produzem uma variedade de compostos que desempenham papéis fundamentais na germinação e no desenvolvimento inicial. Entre esses compostos, destacam-se os hormônios vegetais como giberelinas, ácido abscísico e citocininas. As giberelinas são responsáveis pelo alongamento do caule e das folhas e desempenham um papel crucial na regulação da germinação das sementes, enquanto o ácido abscísico atua como um inibidor da germinação, promovendo a dormência das sementes. As citocininas, por outro lado, promovem a divisão celular e estão igualmente envolvidas na germinação. Além desses, compostos como etileno e ácido salicílico também são produzidos, influenciando diversos processos fisiológicos, incluindo a germinação (Taiz *et al.*, 2017; Chen; Chang; 2015).

Durante a germinação da soja, ocorrem processos metabólicos que resultam na produção de uma série de compostos com funções específicas. As enzimas como α -amilase, protease e lipase são produzidas para decompor amido, proteínas e lipídios armazenados na semente, fornecendo energia para o crescimento da planta. Os fitormônios como giberelinas e auxinas são essenciais para regular o crescimento e desenvolvimento das plantas. As giberelinas estimulam o crescimento do caule e das folhas, enquanto as auxinas influenciam o desenvolvimento das raízes. A soja também produz isoflavonas, como genisteína e daidzeína, com propriedades antioxidantes que protegem a planta contra estresse oxidativo (Kim, 2021).

A germinação da soja também resulta na produção de vitaminas, como vitamina B6 e ácido fólico, importantes para o metabolismo celular e a síntese de DNA. Além disso, aminoácidos essenciais como asparagina e ácido glutâmico são produzidos, fundamentais para a síntese de proteínas e importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta (Taiz *et al.*, 2017).

A qualidade nutricional das sementes de soja tem um impacto direto no crescimento e desenvolvimento da planta. As variações nas características nutricionais das sementes, como teor de proteína, óleo, ácidos graxos, açúcares solúveis e isoflavonas, podem influenciar seu uso em diversas aplicações industriais e programas de melhoramento genético. A composição nutricional das sementes é influenciada tanto pelo aspecto genético da cultivar quanto por fatores ambientais. Além disso, a correlação entre características nutricionais e fatores geográficos, como latitude, longitude e altitude, sugere que a origem das cultivares exerce um efeito pronunciado em suas propriedades nutricionais (Azam *et al.*, 2021).

2.6. Metabolômica

A metabolômica é uma ferramenta analítica poderosa na investigação da atividade e estado do metabolismo. Essa técnica, que explora os produtos finais de processos fisiológicos e possíveis patologias em plantas e animais, envolve a identificação e quantificação de compostos, tanto endógenos quanto exógenos, que são produtos ou substratos de reações químicas em sistemas biológicos (Doroghazi *et al.*, 2014; Cajka; Fiehn; 2016; Liu; Locasale; 2017).

Nos estudos metabolômicos, os experimentos refletem diretamente a atividade fisiológica e as redes metabólicas subjacentes, fornecendo informações essenciais sobre a condição biológica dos sistemas investigados. Isso pode incluir tanto uma triagem 'não direcionada', que avalia metabólitos desconhecidos, quanto abordagens mais direcionadas para identificar metabólitos específicos (Link *et al.*, 2015; Doroghazi *et al.*, 2014). A metabolômica, portanto, é uma ciência em constante evolução, especialmente no campo da botânica, onde busca identificar e analisar os metabólitos presentes em sistemas biológicos, revelando mudanças metabólicas em resposta a diferentes condições de crescimento, estresse e modificações genéticas (Lei; Huang; 2017).

No contexto da cultura da soja, a metabolômica apresenta potencial para avaliar os processos bioquímicos complexos associados ao crescimento, desenvolvimento e respostas da planta a estímulos ambientais. A soja, sendo sensível a diversos estresses ambientais como mencionando anteriormente, é um sistema ideal para o emprego de técnicas “omics”, incluindo a metabolômica. Essa última oferece uma perspectiva única em comparação com genômica e proteômica, ao buscar os metabólitos endógenos sob condições ambientais ou experimentais específicas (Feng *et al.*, 2020).

Por meio da utilização de técnicas analíticas precisas como Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (GC-MS), Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas (LC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a pesquisa metabolômica com a soja pode fornecer informações sobre a identidade e quantidade dos metabólitos, contribuindo significativamente para a compreensão dos mecanismos moleculares que controlam as respostas das plantas ao ambiente. Esse conhecimento é fundamental para desenvolver estratégias que possam aumentar o rendimento das culturas diante dos desafios ambientais (Feng *et al.*, 2020). Neste contexto, a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) foi escolhida como a técnica de análise devido às suas vantagens.

A RMN de ^1H é uma poderosa técnica para a análise de compostos orgânicos de baixa massa molecular. Ela apresenta várias vantagens, como um curto tempo de análise, a capacidade de realizar avaliações qualitativas e quantitativas em uma ampla faixa de polaridade, sendo uma técnica não destrutiva que não requer preparação de derivados das substâncias investigadas. Além disso, a RMN de ^1H requer pouca ou nenhuma separação prévia das amostras e permite a quantificação independente de substâncias, dispensando a necessidade de padrões com a mesma identidade química. Para facilitar a análise de espectros de RMN de ^1H , existem softwares comerciais disponíveis, como o Chenomx, amplamente utilizado por pesquisadores das áreas de saúde e biológicas. Esse software é reconhecido por sua facilidade de uso, capacidade de ajuste manual dos sinais e fornecimento de um banco de dados para a identificação e quantificação de compostos em meio aquoso (Jung *et al.*, 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta, preparação do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e local de estudo

A coleta do BCA foi feita em uma cachaçaria localizada no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil por questões logísticas como equipamentos para preparo e a posição geográfica da unidade da Universidade do Estado de Minas Gerais em João Monlevade. O bagaço foi colocado para secar à temperatura ambiente por três dias. Em seguida, o produto foi pulverizado num Triturador Forrageiro (CID-TRIT75L, CID, Joinville, Brasil) e passado por uma peneira com abertura de 3 mm.

3.2. Preparação do biocarvão a partir do bagaço de cana-de-açúcar

A produção das amostras de biocarvão seguiu a metodologia proposta por Albalasmeh et al. (2020). Para isso, a pirólise foi feita num forno tipo mufla, com cadinhos contendo o BCA e tampados para limitar a presença de oxigênio, nas temperaturas de 300, 400 e 600 °C, sendo as amostras codificadas como BBM300, BBM400 e BBM600, respectivamente. O rendimento gravimétrico (R%) foi determinado usando a seguinte relação:

$$R(\%) = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Em que: m_f e m_i indicam as massas do biocarvão (g) e do BCA (g), respectivamente.

3.3. Caracterização das propriedades físico-químicas das amostras de biocarvão

3.3.1. Determinação do pH e da condutividade elétrica

O pH das amostras de biocarvão foi obtido, em triplicata, a partir da combinação de 2,5 mL do biocarvão com 12,5 mL de CaCl_2 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). A mistura foi agitada em mesa agitadora por 10 min a 220 rpm. Após 30 min em repouso o valor do pH em suspensão foi medido com pHmetro (DM22, Digimed, São Paulo, Brasil).

Também foi mensurada a condutividade elétrica (CE) das amostras, em triplicata, utilizando a mistura de 2 mL g do biocarvão com 20 mL de água deionizada (1:10). A mistura foi agitada em mesa agitadora por 30 s a 220 rpm. Após 30 min em repouso o valor da CE foi registrado com condutímetro de bancada (W12D, BEL Engineering, Monza, Itália).

3.3.2. Caracterização morfológica e elementar

A característica morfológica da superfície das amostras produzidas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (Vega 3 LMU, TESCAN, Brno-Kohoutovice, República Checa) acoplado a um detector de Energia Dispersiva de Raios X (X-MaxN, Oxford, Oxford, Reino Unido) para análises elementares qualitativas. Cada amostra foi depositada sobre fita adesiva de carbono, que foi fixada em stub e analisado empregando-se voltagem de 20kv.

3.3.3. Análise dos grupos funcionais

Os grupos funcionais do BCA e das amostras de biocarvão foram investigados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos), com módulo de Refletância Total Atenuada (ATR). Cada amostra foi colocada sobre o porta-amostra do instrumento e prensadas sobre um cristal de diamante. A medida foi realizada no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução espectral de 8 cm^{-1} e 128 varreduras.

3.3.4. Análise térmica

O BCA e as amostras produzidas de biocarvão foram degradados termicamente em analisador termogravimétrico (STA 7300, Hitachi, Tóquio, Japão). As análises foram realizadas entre 25 a 1000 °C, a 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio e amostras com massas de aproximadamente de 10 mg.

3.4. Ensaios de germinação de sementes de soja

Este experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa Ambiental da Universidade do Estado de Minas Gerais, localizado em Frutal, Brasil. As sementes de soja (*Glycine max* L.), cultivar NS6909, foram adquiridas no mercado local. Os efeitos das amostras de biocarvão sobre a germinação de soja foi analisado seguindo a metodologia proposta por Olszyk et al. (2018), com algumas adaptações. Sendo elas: as sementes de soja foram germinadas em caixas de acrílico transparente (11 x 11 x 3,5 cm) contendo papel de germinação e tampas plásticas de acrílico. Um total de 25 sementes, em triplicata, foram distribuídas sobre o papel de germinação e sementes, obedecendo um padrão uniforme de 5 × 5.

As sementes foram cobertas com 25 g de areia autoclavada (substrato de desenvolvimento) e umedecida com água destilada apenas neste momento o que foi suficiente para manter a umidade em 60% da máxima capacidade de retenção de água (calculada através da capacidade de campo observada para o substrato e substrato com carvão). Esses procedimentos foram repetidos, adicionando-se à areia 1, 3 e 5% (m/m) de cada biocarvão (BBM300, BBM400 e BBM600). As caixas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C em regime alternado de 12 h de luz (fotoperíodo).

Aos 8 dias após o início do experimento, determinou-se o número de sementes germinadas e o comprimento médio da radícula por caixa. Esses dados foram aplicados para os cálculos da Germinação Relativa (GR), Crescimento Médio Relativo da Radícula (CRR) e Índice de Germinação (IG) conforme Equações 2, 3 e 4, respectivamente (AOSA 1983; Tiquia, 2000; Emino; Warman 2013; Gascó et al. 2016). As plântulas obtidas foram secas em estufa com ventilação forçada a 40 °C para determinação da quantidade de Biomassa Seca (BS) por caixa.

$$GR (\%) = \frac{N_B}{N_C} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: GR, N_B e N_C indicam a germinação relativa (%), o número de sementes germinadas no tratamento com o biocarvão e o número médio de sementes germinadas no controle, respectivamente.

$$CRR (\%) = \frac{L_B}{L_C} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: CRR, L_B e L_C indicam o Crescimento Médio Relativo da Radícula (%), o comprimento médio da radícula no tratamento com o biocarvão e o comprimento médio da radícula no controle, respectivamente.

$$IG (\%) = \frac{GR \cdot CRR}{100} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: IG, GR e CRR, indicam o Índice de Germinação (%), a germinação relativa (%) e o Crescimento Médio Relativo da Radícula (%), respectivamente.

3.4.1. Análises fisiológicas e do estado nutricional de plântulas de soja

Para a determinação da atividade da α -amilase adotou-se os procedimentos descritos por AOSA (1983) e os valores foram expressos em μg de amido hidrolizado min^{-1}g de plântula (BS) (Ching, 1973).

3.5. Análise metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Para a obtenção dos extratos, utilizou-se a metodologia descrita por Kim et al. (2012). Um total de 50 mg das plântulas secas (BS) foram submetidas à extração com uma combinação de 0,75 mL de solução tampão de KH₂PO₄ em D₂O (pH 6,0), contendo 0,01% (m/v) do TSP-*d*₄ e 0,75 mL de metanol-*d*₄. Após a combinação dos solventes as amostras foram agitadas por 1 min em vortex. Em seguida, foram colocadas em banho de ultrassom por 20 min e

centrifugadas a 17.000 rpm. Em seguida, 800 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos de RMN com diâmetro de 5 mm.

Os dados foram obtidos em espectrômetro de RMN (Avance Neo 600 MHz, Fällanden, Switzerland). Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos a 300 K com janela espectral de 12 ppm, número de pontos 64k, com pré-saturação do sinal de HDO, 128 promediações, tempos de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 2,6 s e 5 s, respectivamente.

Todos os espectros foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos zgpg30 e calibrados pelo sinal do TSP- d_4 em 0,00 ppm. As fases e linhas de base foram corrigidas automaticamente utilizando o programa Chenomx NMR Suite 9.0 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada). Neste mesmo programa foram realizadas as identificações (putativas) dos compostos por comparação dos espectros obtidos com aqueles de substâncias puras que estavam no banco de dados. Além disso, utilizou-se a área do sinal do TSP- d_4 como referência para a quantificação dos metabólitos.

3.6. Análise estatística e quimiométrica dos dados

Os resultados obtidos para GR, CRR, IG, BS foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa SISVAR® (UFLA, Lavras, Brasil). Os espectros de RMN de ^1H dos extratos da BS foram convertidos a uma matriz de área versus intervalo de 0,04 ppm, conhecidos como bin. As conversões dos espectros em bins foram realizadas com o uso do programa Chenomx NMR Suite 10.0. Os dados do binning foram normalizados com a área total de cada espectro.

Em seguida, os dados foram escalonados por Pareto (EMWAS *et al.*, 2018) e, antes das análises, as regiões δ 4,70-5,00 e δ 3,30-3,40 foram removidas para eliminar qualquer variabilidade devida à supressão do sinal da água e do metanol. Essa matriz foi então submetida a análise de variância simples (One-Way ANOVA) para seleção dos bins com diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em seguida, a matriz foi avaliada por quimiometria, com o método de análise de componentes principais (PCA). Após a identificação dos metabólitos responsáveis pelas diferenças entre os tratamentos, as concentrações desses compostos foram submetidas à análise de grupos hierárquicos (HCA) associada ao mapa de calor, os dados foram normalizados por autoescalonamento e a distância euclidiana foi usada. Todas as análises quimiométricas foram

feitas usando a plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (Xia; Wishart, *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2022).

3.7. Análise de vias metabólicas

A análise do efeito do biocarvão sobre as vias metabólicas também foi feita com o programa MetaboAnalyst 5.0, utilizando o banco de dados KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto) da espécie *Arabidopsis thaliana*, que já foi usada como modelo em outros estudos com soja (Deng *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018; Faustino *et al.*, 2021). Essa análise combina, de forma gráfica, a análise de enriquecimento das vias metabólicas, representada no eixo y, com a análise topológica das vias metabólicas, representada no eixo x. A análise de enriquecimento das vias identifica quais as vias metabólicas que possuem compostos da lista inserida no programa, enquanto a análise topológica mede a centralidade de um metabólito em uma rede metabólica. Dessa forma, é possível estabelecer o impacto de uma via por meio dos resultados do enriquecimento e da centralidade de um metabólito em uma via metabólica específica. Neste trabalho, apenas as vias metabólicas influenciadas significativamente ($p < 0,05$) e com valores de impactos maiores que 0,05 foram selecionadas para avaliação (Yang *et al.*, 2021).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção e caracterização das amostras de biocarvão

O R (%) para produção das amostras de biocarvão diminuiu à medida que a temperatura de pirólise aumentou de 300 °C para 600 °C (Tabela 1). Os valores de R (%) variaram entre 45% e 21%. A Tabela 1 mostra, ainda, os teores dos elementos determinados por EDS. Observa-se aumento do teor de carbono, redução do teor de oxigênio e aumento dos teores de potássio e fósforo para todas as amostras, com o aumento da temperatura de pirólise.

Tabela 1 – Rendimento gravimétrico e características químicas de amostras de biocarvão preparadas a partir do bagaço de cana-de-açúcar (BCA).

Preparadas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (BCHA):								
Amostra	pH (CaCl ₂)	CE (µS cm ⁻¹)	R	C	O	K	P	Outros Elementos
			% m/m					
BBM300	7,3	71,2	45	66,8	33,0	0,20	*	0,00
BBM400	6,4	133,0	29	75,6	23,6	0,45	0,20	0,15
BBM600	8,7	241,7	21	85,4	10,4	3,59	0,30	0,31

*Não detectado; BBM300, BBM400 e BBM600 indicam o biocarvão obtido do BCA e preparado nas temperaturas de 300 °C, 400 °C e 600 °C, respectivamente.

A Tabela 1 mostra, também, que ao aumentar a temperatura de pirólise de 300 °C para 600 °C, os valores de pH e da CE das amostras de biocarvão aumentaram de 7,3 para 8,7 e 71,2 $\mu\text{S cm}^{-1}$ para 241,7 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente. Isso é devido a remoção de grupos funcionais ácidos e ao aumento dos teores de elementos alcalinos e alcalino-terrosos. De fato, os espectros de infravermelho demonstram que, à medida que aumenta a temperatura de pirólise, as bandas de grupos oxigenados diminuem ou desaparecem, o que comprova essa hipótese (Figura 1).

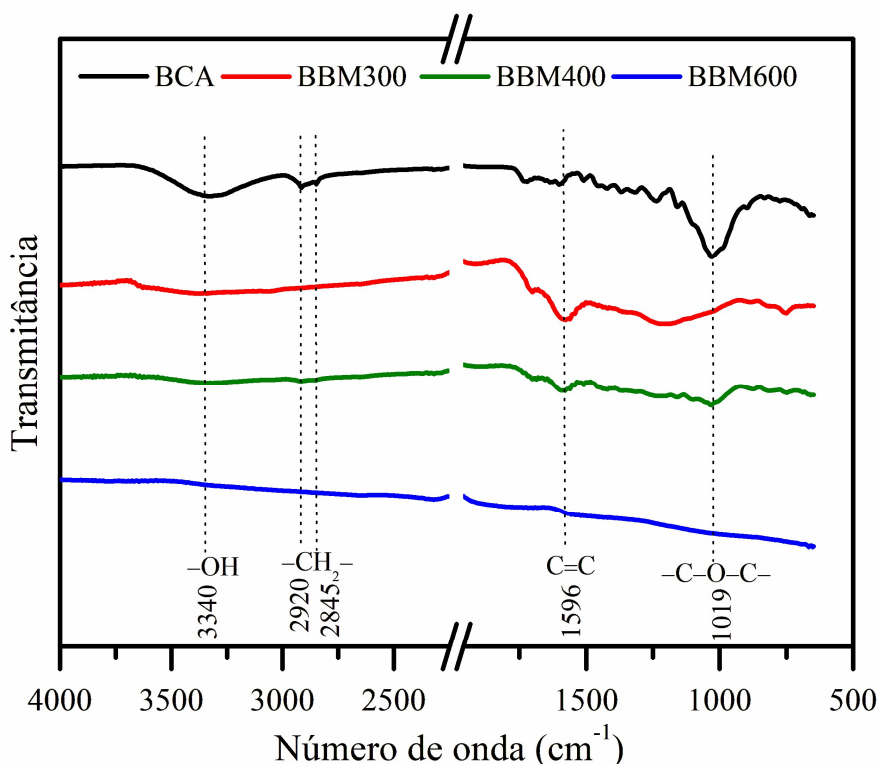


Figura 1 – Espectros de Infravermelho para as amostras de biocarvão obtidas do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600).

Como mostra a Figura 1, também, é possível observar o desaparecimento das bandas em aproximadamente, 2920 cm^{-1} e 2845 cm^{-1} , sendo essas atribuídas aos estiramentos vibracionais simétricos e assimétricos da ligação CH e grupos CH_2 , indicando a ocorrência da pirólise do BCA. Como mostrado acima, fica evidente que há diferenças nas composições das amostras de biocarvão (Tabela 1 e Figura 1). É sabido que, durante a pirólise, a biomassa lignocelulósica (e.g. BCA) se decompõe com aquecimento, geralmente em quatro etapas. O primeiro estágio se estende até 150 °C e caracteriza a perda de água adsorvida. No segundo estágio, que varia entre 230 °C e 260 °C, há a decomposição da hemicelulose e a liberação de gases (e.g. CO e CO_2) e líquidos de baixa massa molar (e.g. CH_3COOH e CH_3OH). Na faixa de temperatura entre 240 °C e 400 °C, há uma significativa perda de massa que decorre da decomposição da celulose e do início da degradação da lignina.

No quarto estágio, a lignina presente decompõe-se em temperaturas superiores a 400 °C. De fato, como é possível observar na curva de decomposição térmica do BCA (Fig. 2), houve uma desidratação da biomassa, resultando numa perda de massa de aproximadamente 7%. No entanto, não ficou claro o limite entre o segundo e terceiros estágios, sendo registrada

uma diminuição da massa de aproximadamente 68% até 400 °C, indicando a decomposição da hemicelulose e da celulose. Além disso, a curva revela uma redução de massa de cerca de 14% entre 400 °C e 600 °C, sugerindo a degradação total da lignina. Por outro lado, as curvas de estabilidade térmica das amostras de biocarvão mostraram que esses materiais são mais estáveis que o BCA. Esse ganho de estabilidade térmica está associado ao rearranjo de átomos de carbono, que geralmente aumenta a porosidade.

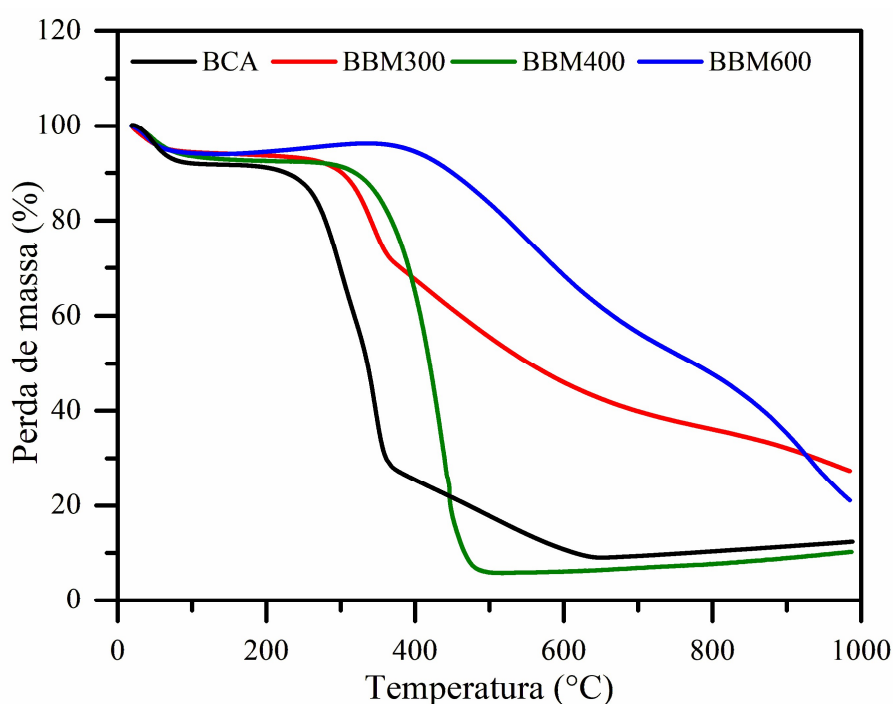


Figura 2 – Curvas termogravimétricas para as amostras de biocarvão obtidas do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi usada para analisar a morfologia das amostras preparadas. Além disso, o BCA também foi estudado para fins de comparação (Fig. 3). As micrografias do BCA, obtidas com o sistema de detecção por elétrons secundários, permitem a visualização da presença de fibras paralelas e poros pequenos. A MEV também mostra a superfície irregular desse subproduto. Também é importante destacar que as características apresentadas são concordantes com as descrições de Resende *et al.* (2011). As micrografias das amostras de biocarvão mostraram mudanças na morfologia com o processo de pirólise, bem como superfícies irregulares.

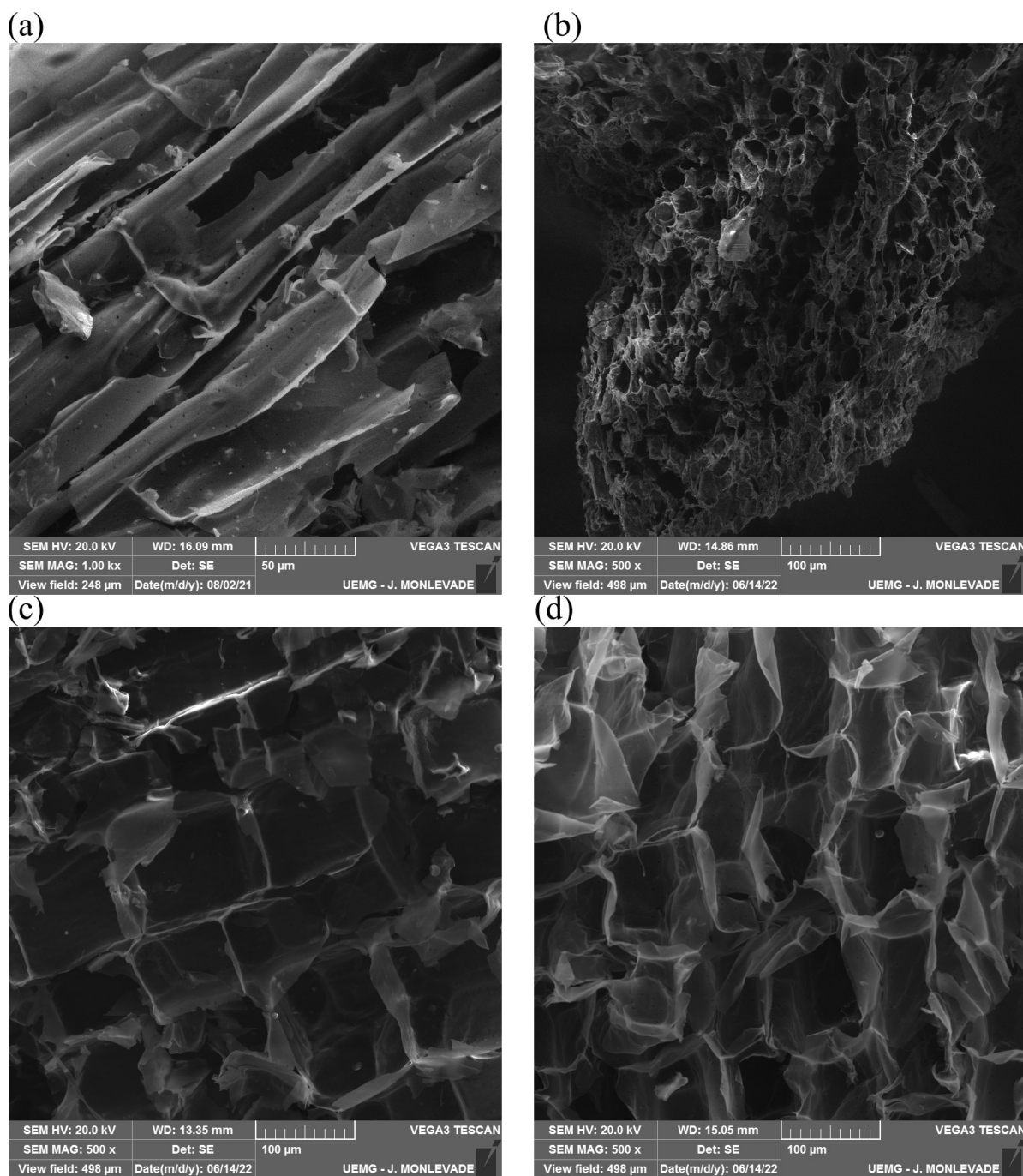


Figura 3 – Micrografias eletrônicas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com detecção por elétrons secundários do (a) bagaço de cana-de-açúcar, com ampliação de 1000 vezes, (b) BBM300, (c) BBM400 e (d) BBM600, com ampliações de 500 vezes.

4.2. Efeito do biocarvão sobre a germinação de soja

O efeito fitotóxico do biocarvão foi avaliado pelo ensaio de germinação de sementes de soja em areia. Os resultados mostraram para todas as amostras e doses, efeitos positivos sobre os parâmetros de crescimento (Fig. 4). Observaram-se, por exemplo, que os valores de GR (%) variaram entre 162% e 252% (Fig. 4a), enquanto os valores de CRR variaram entre 229% a 431% (Fig. 4b). Por isso, os valores de IG (%) excederam a 100%, variando entre 374% e 1015% (Fig. 4c). Além disso, os valores de IG (%) foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que o do controle (0% m/m), com exceção do tratamento com BBM300, na dose de 1% m/m. A produção da BS também aumentou com a adição de biocarvão. Observou-se, por exemplo, aumento de cerca de 35% com a adição de 1% m/m de BBM400 (Fig. 4d).

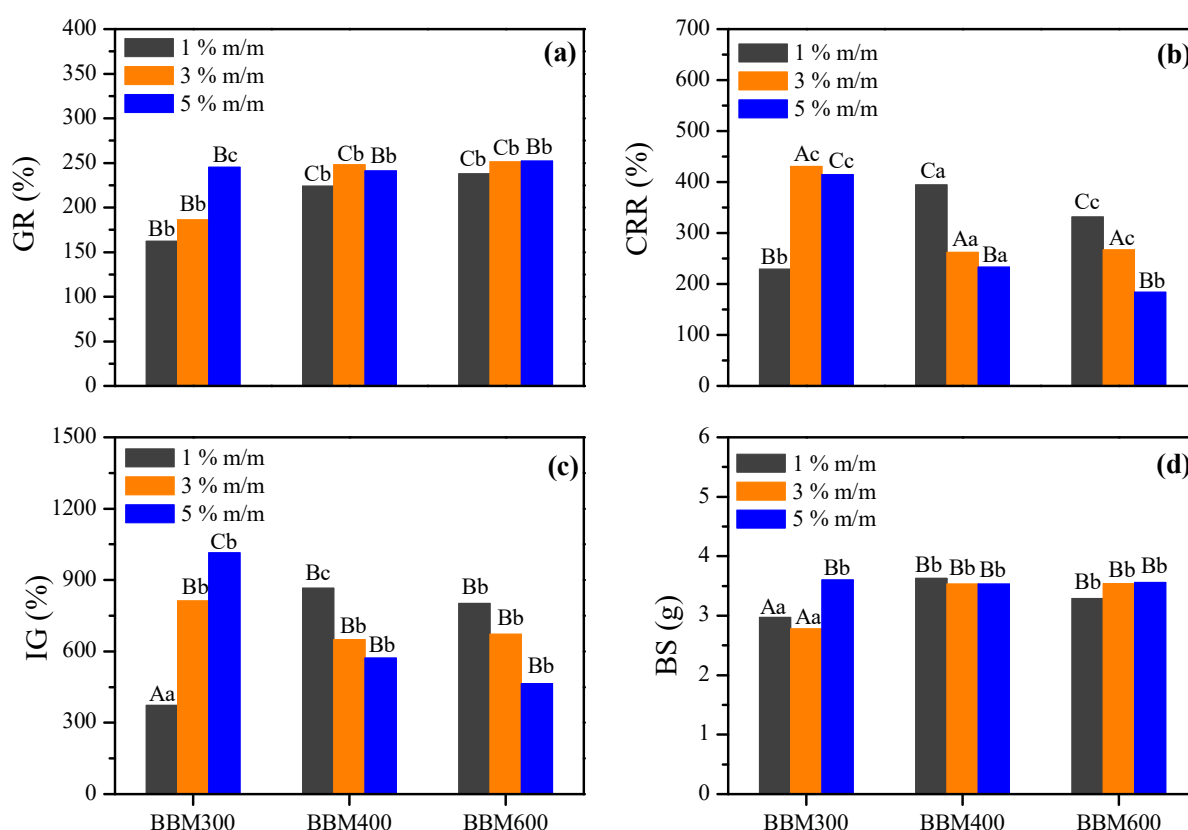


Figura 4 – (a) Germinação Relativa (GR, %), (b) Crescimento Médio Relativo da Radícula (CRR, %), (c) Índice de Germinação (IG, %) e (d) biomassa seca (BS, g) de plântulas de soja cultivadas, por 8 dias, em areia com diferentes doses do biocarvão obtido do bagaço de cana-de-açúcar a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600). Barras seguidas de mesma letra minúscula indicam que as médias

não diferem dentro de cada tratamento e as seguidas de mesma letra maiúscula indicam que as médias dos tratamentos não diferem com a temperatura de pirólise pelo teste Scott-Knott a 5%. Os valores médios para GR, CRR e IG do controle (0% de biocarvão) foram de 100% Aa e para BS foi de 2,68 g Aa.

O IG pode ser usado para classificar o efeito fitotóxico do biocarvão, quando este valor é menor que 50%, o material tem alta fitotoxicidade, entre 50-80%, moderada e maior que 80%, o material não apresenta efeito fitotóxico, quando o IG excede 100%, o produto é considerado fitonutriente ou fitoestimulante (Emino; Warman, 2013; Gascó *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2022b). Dessa forma, todos os biocarvões investigados neste trabalho são classificados com fitonutrientes para a germinação da soja. Esse efeito positivo no crescimento das plântulas pode ser devido à presença e disponibilidade de nutrientes (Asadabadi *et al.*, 2022). É sabido, que após a aplicação do biocarvão, a água que entra nos poros do material dissolve compostos orgânicos e minerais solúveis nas superfícies externa e interna, promovendo o aumento da condutividade elétrica e do pH do substrato (Das; Ghosh; Avasthe, 2020b; Joseph *et al.*, 2021).

Os resultados do ensaio de germinação apontam para a melhoria da emergência e do desenvolvimento de plântulas de soja devido ao metabolismo acelerado da germinação. Isso pode ser função da maior atividade da α -amilase induzida pelo biocarvão, como foi observado em feijão de corda (*Vigna unguiculata*), onde a atividade dessa enzima foi fortemente relacionada com a massa seca das plântulas (Farooq *et al.*, 2021). Os autores argumentaram que a presença do biocarvão no substrato (turfa), durante a germinação, promoveu o acúmulo de açúcar e melhorou o desempenho dessa leguminosa. De fato, os resultados do ensaio para atividade da α -amilase corroboram essa observação (Fig. 5).

A atividade da α -amilase é importante na fase de germinação, pois catalisa a quebra do amido, liberando açúcares necessários para o desenvolvimento do embrião. A Fig. 5 revela que o biocarvão tem efeito sobre essa enzima, o que pode ser um indicativo de sua influência na germinação e no crescimento inicial das plântulas (Fig. 4). Esse efeito pode ser atribuído à melhoria das propriedades substrato, como a retenção de água e nutrientes, ou a interações químicas e biológicas que o biocarvão promovem. Além disso, a temperatura de pirólise e a dose de aplicação do biocarvão influenciam a atividade enzimática. O BBM400 com uma dose de 3% m/m causou o maior valor para atividade da α -amilase, sugerindo que essa combinação pode ser a mais benéfica para o desenvolvimento das plântulas de soja. Por outro lado, na mesma dose o BBM600 resultou em uma redução da atividade enzimática, em comparação ao controle, o que indica que temperaturas mais altas de preparação podem ter efeitos adversos.

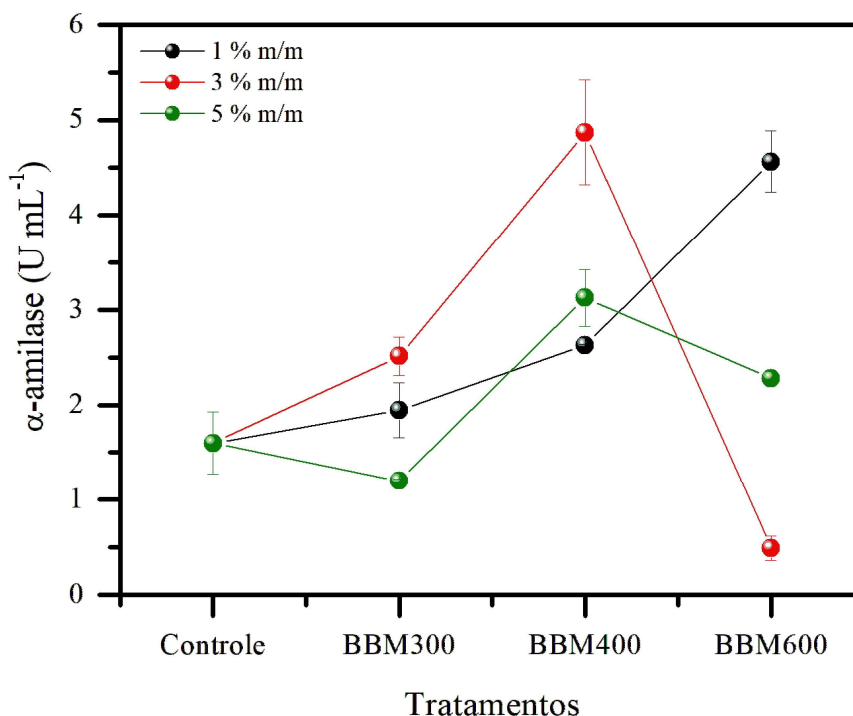


Figura 5 – Atividade da α -amilase de plântulas de soja cultivadas, por 8 dias, em areia com diferentes doses do biocarvão obtido do bagaço de cana-de-açúcar a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600).

O padrão de resposta da atividade da α -amilase às doses de biocarvão não é linear, e a resposta ideal parece depender da temperatura de pirólise do biocarvão. Por exemplo, o biocarvão preparado a 400°C mostra um aumento da atividade da α -amilase com o aumento da dose, enquanto que o biocarvão a 600 °C apresenta o efeito contrário. Essas respostas dose-dependentes destacam a complexidade da interação entre o biocarvão e o substrato das plantas.

Por outro lado, deve-se destacar que os valores de IG (%) aumentaram linearmente apenas com o aumento da dose de BBM300 ($R^2=0,96$), enquanto tendências para reduções lineares foram observadas com o aumento das doses de BBM400 ($R^2 = 0,93$) e BBM600 ($R^2 = 0,98$). Neste sentido, deve-se atentar para as características químicas do biocarvão, especialmente para os teores de cinzas totais das amostras (Tabela 1). A aplicação de altas doses de biocarvão, com alto teor de cinzas, pode aumentar o potencial osmótico do substrato, o que pode reduzir a absorção de água pelas plantas (GAVILI *et al.*, 2019; MANNAN *et al.* 2021).

O condicionamento com biocarvão pode reter mais água no substrato devido a sua estrutura porosa, mas parte dessa água pode não estar disponível para as plântulas devido a um

potencial hídrico relativamente alto (Omondi *et al.*, 2016). Assim, as maiores doses de biocarvão podem influenciar no processo de embebição das sementes, de modo a reter e disponibilizar água para a semente de maneira mais lenta, podendo afetar o processo de germinação sem, contudo, prejudicar a germinação, conforme pode ser observado nos valores de IG (%) que foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que o do controle (0 % m/m), exceto para o tratamento com BBM300, na dose de 1% m/m.

Também vale mencionar que a deficiência de água no meio pode retardar ou mesmo inibir a germinação, mas sabe-se que um estresse hídrico temporário pode, em muitos casos, estimular a velocidade de emergência da radícula. Isso pode, até certo ponto, significar um aumento da biomassa, como foi demonstrado nesta pesquisa (Fig. 1), uma vez que as plantas sob estresse podem acumular açúcares, como a sacarose, com função osmoprotetora (Vital *et al.*, 2022). Além disso, a aplicação de biocarvão aumenta o teor de potássio no substrato, proporcionando maior tolerância ao estresse, como foi proposto por Mannan *et al.* (2021).

Com base nos resultados e discussão acima, levanta-se a hipótese de que as amostras BBM400 e BBM600 causaram ligeiro estresse osmótico e/ou falso hídrico (Joseph *et al.*, 2021; Carril *et al.*, 2023; Volf *et al.*, 2022, Wu *et al.*, 2023). Assim, para compreender as alterações moleculares nas plântulas de soja causadas pela adição de biocarvão ao substrato, foi feita a análise metabolômica.

4.3. Composição dos extratos de plântulas de soja

A composição metabólica das plântulas de soja pode ser alterada por vários fatores bióticos ou abióticos. No presente estudo, o efeito de biocarvões (BBM300, BBM400 e BBM600) e de suas doses (0, 1, 3 e 5% m/m) sobre os perfis metabólicos das plântulas de soja foi avaliado por RMN de ^1H , os espectros representativos de cada tratamento são observados na Figura 6.

A partir do emprego do programa Chenomx e do banco de dados HMDB foi possível identificar vinte e um metabólitos, incluindo seis aminoácidos (alanina, asparagina, isoleucina, prolina, treonina e valina), oito ácidos orgânicos (ácido acético, ácido 4-aminobutírico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico e ácido succínico), duas aminas (betaína e colina), dois derivados de isoflavonas, um carboidrato (sacarose), um álcool (glicerol), um alcaloide (trigonelina).

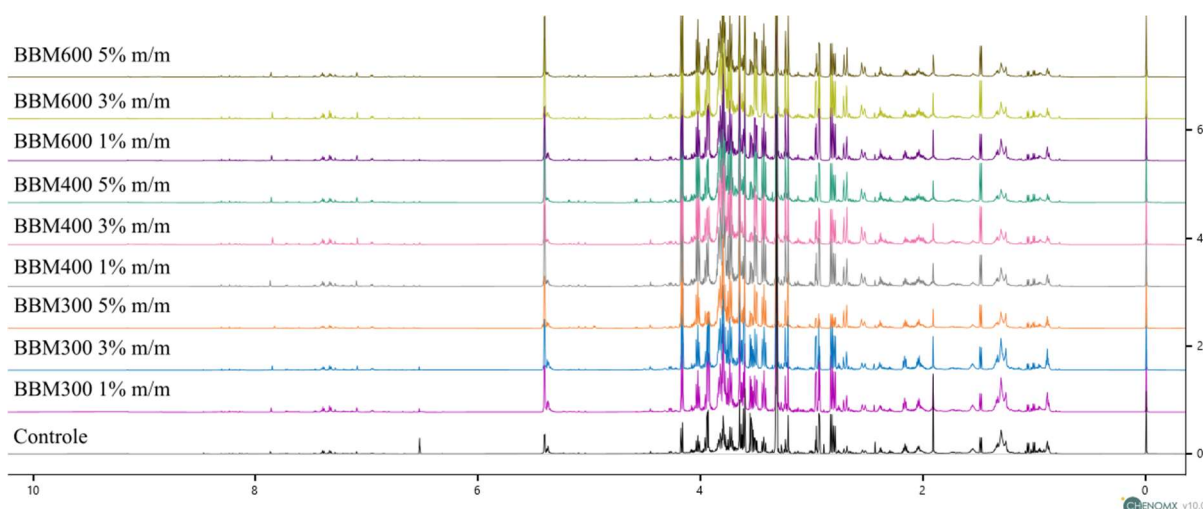


Figura 6 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos de biomassa de plântulas de soja cultivadas em areia (controle) e areia contendo biocarvão pirolisado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 0, 1, 3 e 5% m/m.

4.4. Efeito do biocarvão sobre a produção metabólica

Ao avaliar qualitativamente os espectros de RMN de ^1H (Fig. 6), não é encontrado nenhum novo sinal diretamente relacionado à presença do biocarvão no substrato de cultivo. Assim, exceto pela intensidade dos sinais, nenhuma diferença aparente entre as amostras foi observada. Por isso, para avaliar ainda mais os dados de RMN de ^1H e explorar os efeitos dos tratamentos sobre a produção metabólica das plântulas de soja, realizou-se a análise de variância simples. Esse teste estatístico resultou na identificação de 117 bins (áreas de sinal de RMN de ^1H) significativos e 94 não significativos, entre os tratamentos (Figura 7).

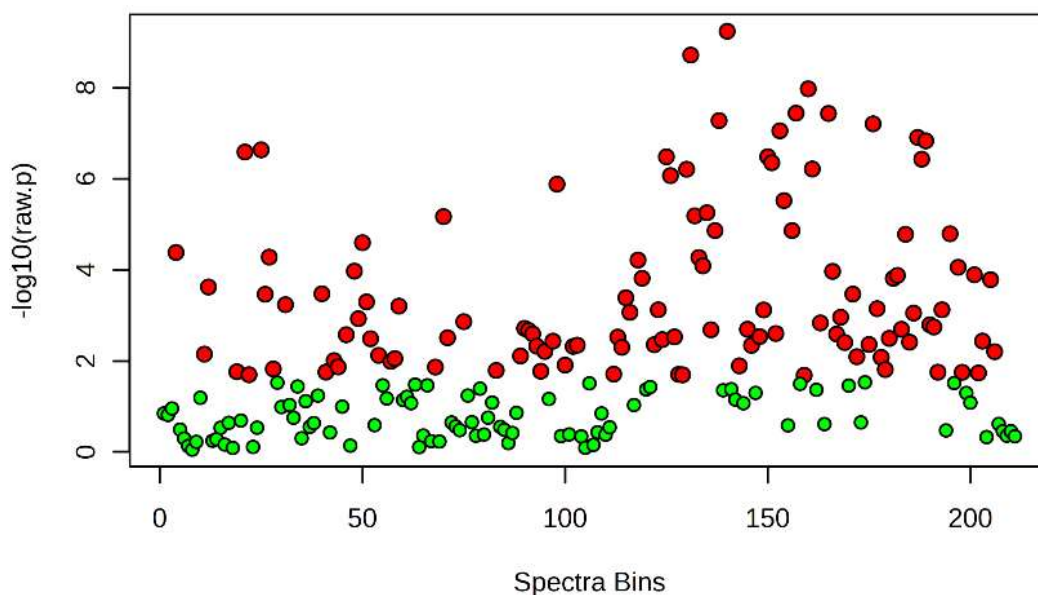


Figura 7 - Gráfico dos valores de $-\log(p\text{-valor})$ obtido a partir da análise de variância simples. Os bins significativos são apresentados em vermelho ($n = 94$) e os não significativos em verde ($n = 139$).

Com base no resultado anterior foi feita a Análise de Componentes Principais (PCA), com o objetivo de reduzir ainda mais a dimensionalidade dos dados, buscando semelhanças e diferenças entre os tratamentos. A projeção das amostras no novo sistema de eixos (componentes) do modelo PCA é mostrada na Figura 8. Os componentes 1 e 2 (PC1 e PC2) explicaram 72,9 e 9,7% da variância total, respectivamente. As amostras do controle, BBM300 (1 e 3% m/m) e BBM600 (1 % m/m) são separadas das demais pela PC1. Pode-se ainda observar uma ligeira separação entre as amostras do controle e àquelas dos tratamentos BBM300 (nas doses de 1 e 3% m/m) e BBM600 (na dose de 1% m/m). Na verdade, as amostras do controle estão mais à esquerda, isto é, na área negativa da PC1. Para a PC2 não foram observadas separações claras entre os tratamentos.

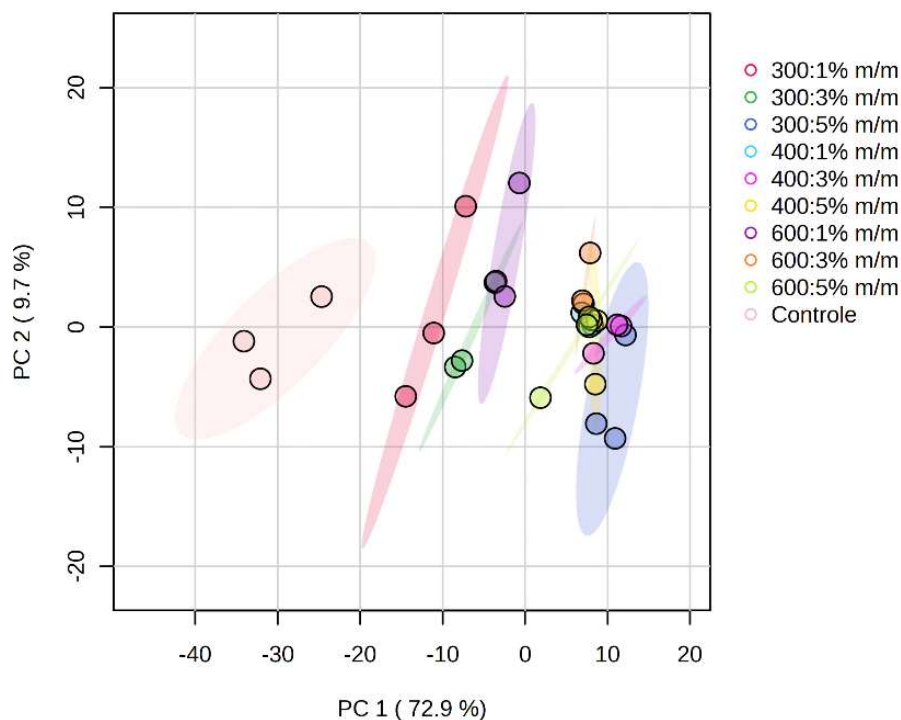


Figura 8 – Gráfico de escores da componente 1 versus componente 2 da Análise de Componentes Principais (PCA) dos extratos das plântulas de soja cultivadas em areia (controle) e em areia com biocarvão pirolizado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 1, 3 e 5% m/m. As elipses ao redor das amostras foram traçadas com 95% de confiança.

Os agrupamentos encontrados no modelo PCA sugerem que o perfil metabólito das plântulas cultivadas em areia (controle) foi distinto dos perfis das plântulas cultivadas em areia com biocarvão. O gráfico de pesos (loadings) para PC1 versus PC2 (Figura 9) foi analisado para identificar os metabólitos responsáveis pelos agrupamentos. Os metabólitos identificados e mais relevantes para a separação das amostras são os 1) ácidos graxos; 2) alanina; 3) ácido acético; 4) ácido succínico; 5) ácido cítrico; 6) asparagina; 7) glicerol; 8) sacarose; 9) ácido fumárico; 10) derivados de isoflavonas; 11) ácido fórmico.

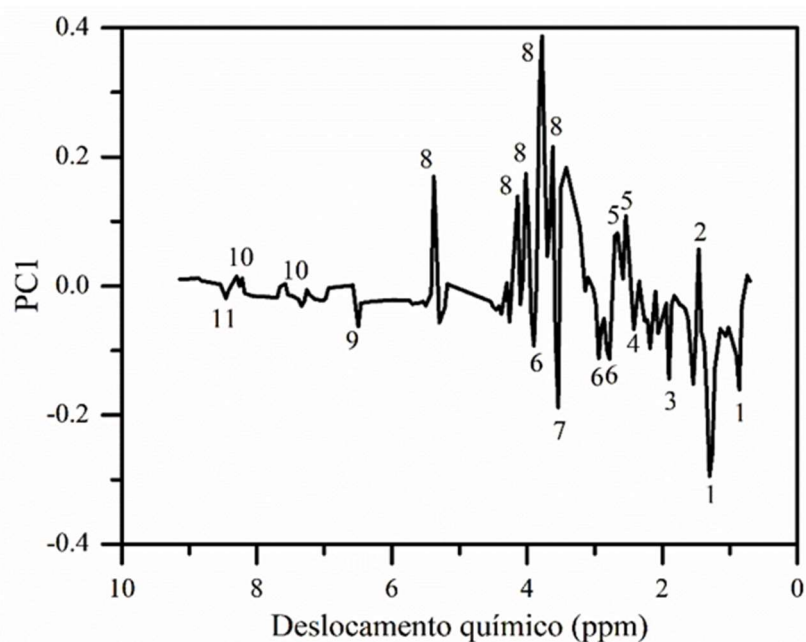


Figura 9 – Gráfico de pesos da componente 1 da Análise de Componentes Principais (PCA) dos extratos das plântulas de soja germinadas em areia (controle) e em areia com biocarvão pirolisado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 0, 1, 3 e 5% m/m. As elipses ao redor das amostras foram traçadas com 95% de confiança grupo. 1) ácidos graxos; 2) alanina; 3) ácido acético; 4) ácido succínico; 5) ácido cítrico; 6) asparagina; 7) glicerol; 8) sacarose; 9) ácido fumárico; 10) derivados de isoflavonas; 11) ácido fórmico.

Para facilitar a visualização dessas informações foi obtido o dendograma do HCA associado ao mapa de calor, a partir das concentrações desses metabólitos, excetuando os ácidos graxos e os derivados de isoflavonas, que não foram quantificados. Embora, apesar de não terem sido quantificados, como a área de um sinal de RMN de ^1H é proporcional ao número de átomos responsáveis por aquele sinal, pode-se inferir que os tratamentos com o biocarvão promoveram a redução de ácidos graxos e o aumento dos derivados de isoflavonas nos extratos das plântulas. Ademais, foram incluídas nessa análise as concentrações de outros metabólitos que puderam ser quantificados neste estudo.

A HCA corrobora os resultados anteriores e deixa mais evidente a formação de dois grupos distintos, sendo o primeiro composto pelo controle e os tratamentos com BBM300 (nas doses de 1 e 5 % m/m) e o segundo formado pelos demais tratamentos. Tais resultados mostram que o biocarvão do bagaço de cana-de-açúcar, nas diferentes doses, estimula a ocorrência de reações metabólicas diversas e induz a ativação ou inativação da síntese de metabólitos na germinação de sementes de soja.

4.5. Efeito do biocarvão sobre as vias metabólicas

Com base nas concentrações dos metabólitos que mostraram alterações significativas devido aos tratamentos com biocarvão, foram identificadas cinco vias metabólicas com alterações significativas ($p < 0,05$) e com impacto $> 0,05$ (Fig.10). São elas: 1) Ciclo do ácido cítrico; 2) Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; 3) Metabolismo da tirosina; 4) Metabolismo do butirato e 5) Metabolismo de amido e sacarose.

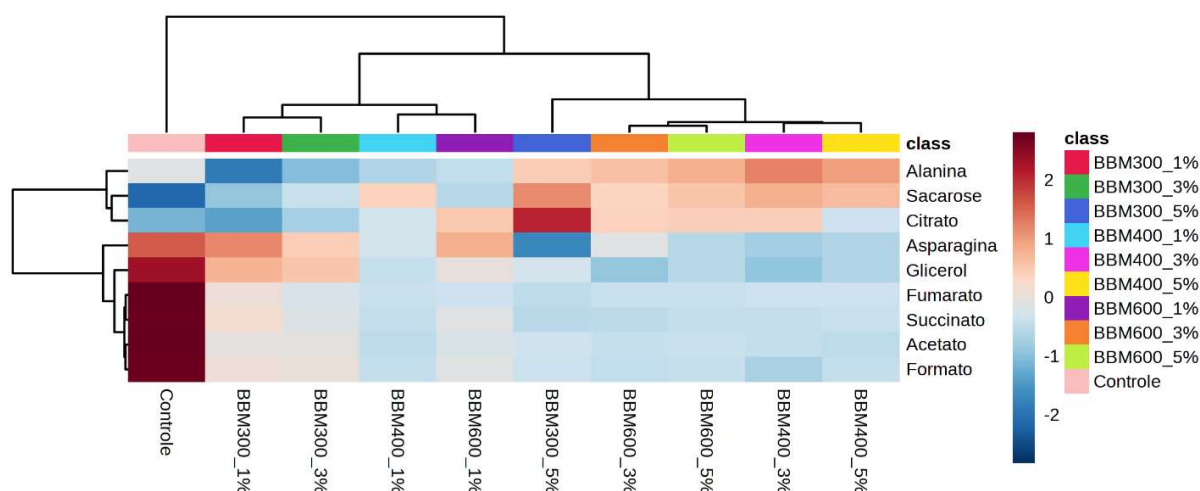


Figura 10 – Dendrograma do HCA associado ao mapa de calor dos compostos quantificados nos extratos das plântulas de soja cultivadas em areia (controle) e em areia com biocarvão pirolisado a 300 °C (BBM300), 400 °C (BBM400) e 600 °C (BBM600), nas doses de 0, 1, 3 e 5% m/m. A cor de cada mudança de seção de azul escuro a carmesim no mapa de calor corresponde a uma mudança de baixo para alto para cada concentração de metabólito.

Os resultados da análise de via metabólica parem estar em consonância com os demais resultados alcançados neste trabalho. Por exemplo, foi observado aumento na concentração do ácido cítrico e reduções nas concentrações de outros intermediários do CAT (ácido fumárico e ácido succínico). Por isso é esperado uma redução da atividade do CAT devido ao efeito modulador inibitório do ácido cítrico, levando a um aumento da gliconeogênese (Iacobazzi; Infantino 2014; Noster *et al.*, 2019). De fato, conforme descrito na literatura, a análise transcriptômica de soja submetida a doses elevadas (5 % m/m) de biocarvão da casca do bordo ou acer (*Acer* sp.) resultou numa diminuição na quantidade de genes transcritos associados ao metabolismo primário, incluindo a via do ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) (Copley *et al.*, 2017).

Essa hipótese explica, pelo menos de forma parcial, as reduções das concentrações dos ácidos graxos e glicerol e o aumento da concentração de sacarose, nas plântulas cultivadas na presença do biocarvão (Figura 11). É sabido que após germinarem, as sementes de soja metabolizam os triacilglicerídeos armazenados, convertendo-os em moléculas de ácidos graxos e glicerol, que, posteriormente, são convertidos em sacarose, liberando energia para a germinação (Zhou *et al.*, 2021). Deve-se ainda destacar que a mobilização do ácido cítrico é inibida para economizar energia, e uma variedade de carboidratos, como agentes osmoprotetores, são induzidos para mitigar os efeitos adversos do estresse hídrico. Além disso, tem sido proposto que o maior acúmulo de ácido cítrico está associado a resistências de cultivares de soja à seca (Wang *et al.*, 2022).

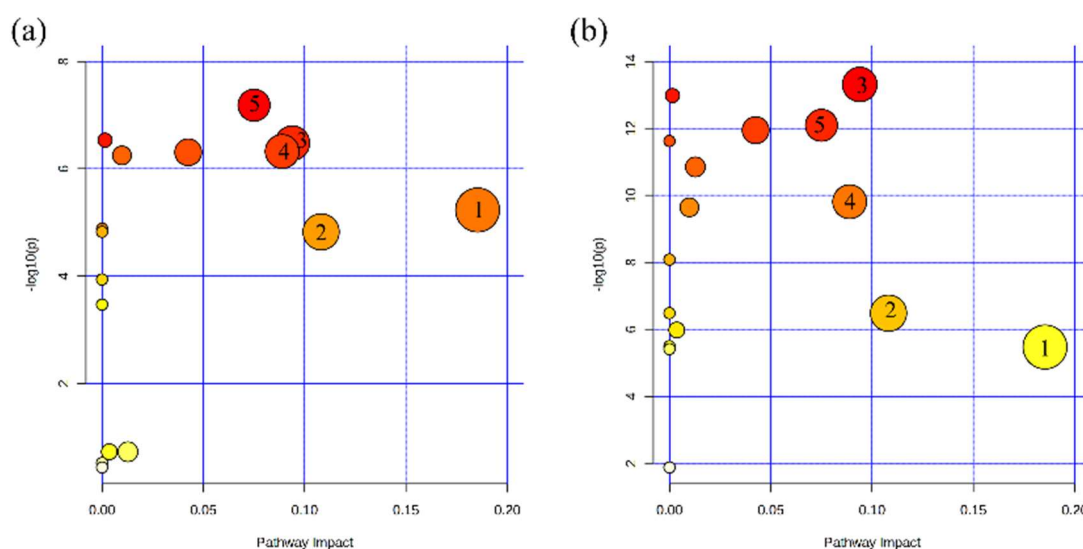


Figura 11 – Gráfico de impacto das vias metabólicas identificadas a partir da alteração significativa de nove metabólitos quantificados nos extratos das plântulas de soja. (a) Controle versus BBM300 (nas doses de 1 e 3% m/m), BBM400 e BBM600 (nas doses de 1% m/m). (b) Controle versus BBM300 (na dose de 5% m/m), BBM400 (nas doses de 3 e 5% m/m) e BBM600 (nas doses de 3 e 5% m/m). A cor dos círculos é classificada de acordo com o p-valor e o tamanho revelam o impacto na via. Apenas as 5 vias metabólicas com $p < 0,05$ e impacto $> 0,05$ foram destacadas. São elas: 1) Ciclo do ácido cítrico; 2) Metabolismo da tirosina; 3) Metabolismo de amido e sacarose; 4) Metabolismo do piruvato e 5) Metabolismo de enxofre

Conforme mencionado anteriormente e agora apoiado pelos resultados metabolômicos, o aumento de sacarose, pelo menos em parte, pode ser devido à ativação dos mecanismos de defesa ao estresse provocado pelas amostras de biocarvão, uma vez que a função osmoprotetora da sacarose em soja é bem conhecida. Além disso, foi encontrado acúmulos para alanina,

betaína, colina, Gaba e trigonelina, para maioria dos extratos das plântulas de soja cultivadas na presença de biocarvão. Essas substâncias também atuam como osmoprotetores (Phang *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2017; Barnawal *et al.* 2019, Li *et al.*, 2021). A alanina, por exemplo, pode desempenhar um papel na resposta ao estresse e defesa das plantas. Em condições de alta salinidade, as plantas podem acumular alanina como um composto osmótico, ajudando a manter o equilíbrio e protegendo as células contra danos (Taiz *et al.*, 2017). As mudanças nos teores de alanina corroboram o impacto na via metabólica desse aminoácido (Figura 9). O Gaba também eleva a tolerância da planta ao estresse, melhorando a fotossíntese, inibindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativando enzimas antioxidantes e regulando a abertura estomática durante o estresse hídrico (Li *et al.*, 2021). Obviamente isso também impacta a via do metabolismo do butirato (Figura 11). Deve-se ainda destacar que a soja responde às mudanças do substrato por meio de vários ajustes fisiológicos, metabólicos e anatômicos (Jumrani; Bhatia; 2019; Almeida *et al.*, 2021; Vital *et al.*, 2022). Modificações anatômicas no sistema radicular, por exemplo, foram relatadas para plântulas de soja cultivadas em areia com biocarvão, juntamente com o aumento de açúcares solúveis (Zhu *et al.*, 2018). Em conjunto, esses resultados reforçam a hipótese de que doses elevadas de biocarvão podem causar estresse durante a germinação da soja, sem causar impacto sobre a germinação e a produção de biomassa.

A análise metabolômica revelou ainda redução dos teores de asparagina devido aos tratamentos com biocarvão (Fig. 11). Esse resultado é coerente com o fato de que o acúmulo de asparagina é regulado de forma negativa pelo aumento do teor de sacarose (Oddy *et al.*, 2020). A concentração do ácido acético também diminuiu e pode estar associada a vias metabólicas não incluídas dentro dos critérios estabelecidos ($p < 0,05$ e impactos maiores que 0,05) como a via do metabolismo do enxofre, uma vez que esse composto é um dos produtos dessa via. No entanto, essa redução pode ainda estar associada a outras vias metabólicas, como a via do piruvato ou àquelas relacionadas a produção de polissacarídeos, celulose e hemicelulose, que são componentes estruturais da planta e causam incremento da biomassa no vegetal (Taiz *et al.*, 2017).

Também vale mencionar o impacto registrado para via metabólica da tirosina que pode ser devido à regulação do CAT por meio da supressão do ácido fumárico (Schenck; Maeda 2018). Por fim, outro resultado importante que a metabolômica revelou foi o ligeiro aumento da intensidade dos sinais de RMN de ^1H dos derivados de isoflavonas nos extratos das plântulas

cultivadas em areia com biocarvão. De fato, as sementes de soja contêm entre 0,2% a 0,4% de isoflavonas e esse teor pode ser influenciado por fatores externos, como condições climáticas e do ambiente de cultivo (Kim *et al.*, 2012; Mureşan *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021). Além disso, Waqas *et al.* (2017) demonstraram que o biocarvão de madeira é uma fonte adicional de nutrientes que pode aumentar diversas isoflavonas na soja, como daidzeína e gliciteína. Essa classe de compostos, incluindo os seus derivados, tem despertado grande interesse da comunidade científica, pois apresentam semelhanças estruturais e funcionais ao estradiol, sendo chamadas de fitoestrógenos. O aumento das isoflavonas na soja pelo uso do biocarvão pode ser um benefício na produção destes fitohormônios.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho investigou o efeito da temperatura de pirólise nas características físico-químicas do biocarvão, bem como no desenvolvimento de plântulas de soja. Os resultados obtidos fornecem informações valiosas sobre a otimização da produção de biocarvão e suas aplicações agrícolas. Por exemplo, foi constatado que a temperatura de pirólise é um parâmetro que afeta diretamente as propriedades do biocarvão. As variações observadas nas propriedades químicas e físicas, incluindo alterações nos teores de carbono, oxigênio, potássio e fósforo, são indicativas da complexa interação entre a temperatura e a composição do biocarvão. Isso sugere que o controle da temperatura de pirólise é essencial para a produção de biocarvão com características desejadas.

Em relação ao crescimento de plântulas de soja, foi evidenciado efeitos significativos com a aplicação do biocarvão. Deve-se destacar, que o efeito variou conforme a dose e a temperatura de pirólise, indicando também uma relação dose-resposta. Além disso, todas as amostras de biocarvão estimularam o desenvolvimento das plântulas de soja em condições de cultivo em areia, o que aponta para o potencial do biocarvão como um aditivo benéfico em substratos de crescimento agrícola.

A análise metabolômica revelou alterações significativas nas vias metabólicas das plântulas de soja em resposta à presença do biocarvão. Mudanças no metabolismo de sacarose, ácido cítrico, tirosina, piruvato e enxofre foram observadas, refletindo uma resposta adaptativa complexa das plantas à presença do biocarvão. Os resultados sugerem que biocarvão influencia o metaboloma das plântulas de soja, possivelmente por meio de mecanismos de defesa ao estresse e alterações fisiológicas, metabólicas e morfológicas. Essa interação parece acelerar o catabolismo de triacilglicerídeos para sacarose, um indicativo de adaptação metabólica das plântulas ao ambiente modificado.

Finalmente, é importante destacar que o uso de doses elevadas de biocarvão, especialmente aqueles pirolisados a 400 °C e 600 °C, pode induzir estresse osmótico nas plântulas de soja. Essa observação abre caminho para pesquisas futuras, visando aprofundar o entendimento dos efeitos do biocarvão em condições de estresse e a otimização de sua aplicação na agricultura.

6. REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; ABDELHAFEZ, A. M. H. H.; LI, J. Biochar: the black diamond for soil sustainability, contamination control and agricultural production. *In: Engineering Applications of Biochar*. Ed. Huang, W. J. 2017. 92 p.
- ALBALASMEH, A.; GHARAIBEH, M. A.; MOHAWESH, O.; AJLOUNI, M. et al. Characterization and Artificial Neural Networks Modelling of methylene adsorption of biochar derived from agricultural residues: effect of biomass type, pyrolysis temperature, particle size. **Journal of Chemical Society**, [s.l.], v. 24, n. 11, p. 811-823. 2020.
- ALBALASMEH, A.; GHARAIBEH, M. A.; MOHAWESH, O.; ALAJLOUNI, M.; QUZAIH, M.; MASAD, M.; EL HANANDEH, A. Characterization and Artificial Neural Networks Modelling of methylene blue adsorption of biochar derived from agricultural residues: Effect of biomass type, pyrolysis temperature, particle size. **Journal of Saudi Chemical Society**, [s.l.], v. 24, n. 11, p. 811–823, 2020.
- ALGAR, E. *et al.* Bacterial bioeffectors modify bioactive profile and increase isoflavone content in soybean sprouts (*Glycine max* var Osumi). **Plant Foods for Human Nutrition**, [S.L.], v. 68, p. 299–305, 2013.
- ALI, L.; XIUKANG, W.; NAVEED, M.; ASHRAF, S.; NADEEM, S. M.; HAIDER, F. U.; MUSTAFA, A. Impact of Biochar Application on Germination Behavior and Early Growth of Maize Seedlings: Insights from a Growth Room Experiment. **Applied Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 24, p. 11666, 2021.
- ALMEIDA, G. M.; COSTA, A. C.; BATISTA, P. F.; JUNQUEIRA, V. B.; RODRIGUES, A. A.; SANTOS, E. C. D.; VIEIRA, D. A.; OLIVEIRA, M. M.; SILVA, A. A. Can light intensity modulate the physiological, anatomical, and reproductive responses of soybean plants to water deficit? **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 2, p. 1301–1320, 2021.
- AOSA - Association of Official Seed Analysts (Ed.) **Seed vigor testing handbook**. Contrib. n.32 to the Handbook on seed testing. 1983. 88p.
- ARAÚJO, S.; PAGANO, A.; DONDI, D.; LAZZARONI, S.; PINELA, E.; MACOVEI, A.; BALESTRAZZI, A. Metabolic signatures of germination triggered by kinetin in *Medicago truncatula*. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, 2019.
- ASADABADI, R. S.; HAGE-AHMED, K.; STEINKELLNER, S. Response of sunflower and soybean to infection with *Sclerotinia sclerotiorum* with addition of organic amendments. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [s.l.], v. 129, n. 6, p. 1367–1376, 2022.
- AZAD, M. O. K.; KIM, W. W.; PARK, C. H.; CHO, D. H. Effect of artificial LED light and far infrared irradiation on phenolic compound, isoflavones and antioxidant capacity in soybean (*Glycine max* L.) sprout. **Foods**, [s.l.], v. 7, 174, 2018.
- AZAM, M. *et al.* Profiling and associations of seed nutritional characteristics in Chinese and

USA soybean cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 98, 103803, p. 1-10, 2021.

AZMIN, S. N. H. M.; HAYAT, N. A. B. M.; NOR, M. S. M. Development and characterization of food packaging bioplastic film from cocoa pod husk cellulose incorporated with sugarcane bagasse fibre. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 248-255, 2020.

BRIGGS, C. M.; BREINER, J. M.; GRAHAM, R. C. Contributions of *Pinus ponderosa* charcoal to soil chemical and physical properties. In the ASACSSA-SSSA International Annual Meetings (November 6–10, 2005), Salt Lake City, USA, pp 1–13. 2005.

BU, X.; XUE, J.; WU, Y.; MA, W. Effect of Biochar on Seed Germination and Seedling Growth of *Robinia pseudoacacia* L. In Karst Calcareous Soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s.l.], v. 51, n. 3, p. 352–363, 2020.

BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 50, p. 5-20, 2021.

BUSSCHER, W. J.; NOVAK, J. M.; AHMEDNA, M. Physical effects of organic matter amendment of southeastern US coastal loamy sand. **Soil Science**, [s.l.], v. 176, p. 661–667, 2010.

CAJKA, T.; FIEHN, O. Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 88, p. 524-545, 2016

CALIGIANI, A.; PALLA, G.; MAIETTI, A.; CIRLINI, M.; BRANDOLINI, V. H. NMR Fingerprinting of Soybean Extracts, with Emphasis on Identification and Quantification of Isoflavones. **Nutrients**, [s.l.], v. 2, p. 280-289, 2010.

CANTELLI, K. C., *et al.*, Sprouts of genetic soybean lines: Evaluation of chemical-physical properties. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s.l.], v. 20, e2016074, 2017.

CARRIL, P.; GHORBANI, M.; LOPPI, S.; CELLETTI, S. Effect of Biochar Type, Concentration and Washing Conditions on the Germination Parameters of Three Model Crops. **Plants**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 2235, 7 Jun. 2023.

CATRINCK, M. N.; BARBOSA, P. S.; FILHO, H. R. O.; MONTEIRO, R. S.; BARBOSA, M. H. P.; RIBAS, R. M.; TEÓFILO, R. F. One-step process to produce furfural from sugarcane bagasse over niobium-based solid acid catalysts in a water medium. **Fuel Processing Technology**, [s.l.], v. 207, 106482. 2020.

CHA, J. S.; PARK, S. H.; JUNG, S. C.; RYU, C.; JEON, J. K.; SHIN, M. C.; PARK, Y. K. Production, and utilization of biochar: a review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. [s.l.], v. 40, p. 1-15, 2016.

CHANDEL, A. K. *et al.* Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012.

CHEN, Y.; CHANG, S. K. C. Macronutrients, phytochemicals, and antioxidant activity of soybean sprout germinated with or without light exposure. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 80, p. 1391–1398, 2015.

CHING, T. M. Biochemical aspects of seed vigour. **Seed Science & Technology**, Zürich, v. 1, n. 1, p. 73-88, 1973.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. 3º Levantamento 2023/24, v. 11, n. 3, 2023.

COPLEY, T.; BAYEN, S.; JABAJI, S. Biochar Amendment Modifies Expression of Soybean and Rhizoctonia solani Genes Leading to Increased Severity of Rhizoctonia Foliar Blight. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 8, n. 221, 2017.

COUTINHO, I. D.; HENNING, L. M. M.; DÖPP, S. A.; NEPOMUCENO, A.; MORAES, L. A. C.; MARCOLINO-GOMES, J.; RICHTER, C.; SCHWALBE, H.; COLNAGO, L. A. Flooded soybean metabolomic analysis reveals important primary and secondary metabolites involved in the hypoxia stress response and tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 153, p. 176–187, 2018.

DAS GRAÇAS SOUZA, K.; DE OLIVEIRA, M. A.; ALCANTARA, G. U.; PAULINO, G. M.; DE LIMA, R. P.; FERREIRA, O. E.; DA SILVA BEZERRA, A. C.; PIMENTA, L. P. S.; MACHADO, A. R. T. Effect of pyrolysis temperature on the properties of the coffee grounds biochar and composition of its leachates. **Chemical Papers**, [s.l.], v. 77, p. 3947-3956, 2023.

DAS, S. K.; GHOSH, G. K.; AVASTHE, R. Ecotoxicological responses of weed biochar on seed germination and seedling growth in acidic soil. **Environmental Technology & Innovation**, [s.l.], v. 20, 101074, 2020a.

DAS, S. K.; GHOSH, G. K.; AVASTHE, R. Evaluating biomass-derived biochar on seed germination and early seedling growth of maize and black gram. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 5663–5676, 2020b.

DENG, J.; YANG, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Q.; YANG, F.; YANG, W.; LIU, J. Organ-Specific Differential NMR-Based Metabonomic Analysis of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Fruit Reveals the Metabolic Shifts and Potential Protection Mechanisms Involved in Field Mold Infection. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 8, 25 Apr. 2017.

DIKINYA, O.; MUFWANZALA, N., 2010. Chicken manure-enhanced soil fertility and productivity: Effects of application rates. **Journal of Soil Science and Environmental Management**, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 46-54, 2010.

DING, Y.; LIU, Y.; LIU, S.; LI, Z.; TAN, X.; HUANG, X.; ZHENG, G.; ZHOU, L.; ZHENG, B. Biochar to improve soil fertility: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, [s.l.], v. 36, n. 36, 2016.

DOMBINOV, V.; HERZEL, H.; MEILLER, M.; MÜLLER, F.; WILLBOLD, S.; ZANG, J. W.; DA FONSECA-ZANG, W. A.; ADAM, C.; KLOSE, H.; POORTER, H.; JABLONOWSKI, N. D.; SCHREY, S. D. Sugarcane bagasse ash as fertilizer for soybeans: Effects of added residues on ash composition, mineralogy, phosphorus extractability and plant availability. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 13, 1041924, 2022.

DOROGHAZI, J. R. *et al.* A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. **Nature Chemical Biology**, [s.l.], v. 10, p. 963-968, 2014.

EMBRAPA – Empresa Agropecuária Brasileira. **Soja em Números (Safrá 2021/2022)**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em 12 abr. 2023.

EMINO, E. R.; WARMAN, P. R. Biological Assay for Compost Quality. **Compost Science & Utilization**, v. 12, n. 4, p. 342–348, 2013.

EMWAS, A.-H.; SACCENTI, E.; GAO, X.; MCKAY, R. T.; DOS SANTOS, V. A. P. M.; ROY, R.; WISHART, D. S. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D 1H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, [s.l.], v. 14, n. 3, 2018.

COUTINHO, I. D.; HENNING, L. M. M.; DOPP, S. A. *et al.* Flooded soybean metabolomic analysis reveals important primary and secondary metabolites involved in the hypoxia stress response and tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 153, p. 176-187, 2018.

EUM, H. L.; PARK, Y.; YI, T. G.; LEE, J. W.; HA, K. S.; CHOI, I. Y.; PARK, N. I. Effect of germination environment on the biochemical compounds and anti-inflammatory properties of soybean cultivars. **PLoS One**, v. 15, e0232159, 2020.

FAJINMI, O. O.; OLAREWAJU, O. O.; VAN STADEN, J. Role of fire and fire cues in seed germination, seedling vigor, and establishment of species from fire-prone vegetation and its potential in African underutilized leafy vegetables and edible weeds. **Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development**. [s.l.], p. 137–164, 2021.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Technologies and Practices for Small Agricultural Producer (TECA)**. Biochar. 2021.

FARDHYANTI, D. S. *et al.* Production of bio-oil from sugarcane bagasse by fast pyrolysis and removal of phenolic compounds. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s.l.], v. 14, p. 217-227, 2024

FAUSTINO, V. A.; GOUVEIA, A. de S.; COUTINHO, F. S.; DA SILVA JÚNIOR, N. R.; BARROS, R. de A.; MERIÑO CABRERA, Y.; VITAL, C. E.; LORIATO, V. A. P.;

- MARTINS, L. G. C.; FONTES, E. P. B.; RAMOS, H. J. de O.; OLIVEIRA, M. G. A. Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatilis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 190, p. 104594, 2021.
- FENG, Z.; DING, C.; LI, W.; WANG, D. CU, D. Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 310, p. 1-9, 2020.
- FIDEL, R. B.; LAIRD, D. A.; PARKIN, T. B. Effect of Biochar on Soil Greenhouse Gas Emissions at the Laboratory and Field Scales. **Soil System**, [s.l.], v. 3, n. 8, 2019.
- FRENCH, E.; IYER-PASCUZZI, A. S. A role for the gibberellin pathway in biochar-mediated growth promotion. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, 2018.
- GABHANE, J. W.; BHANGE, V. P.; PATIL, P. D.; BANKAR, S. T.; KUMAR, S. Recent trends in biochar production methods and its application as a soil health conditioner: a review. **SN Applied Sciences**, [s.l.], v. 2, 1307, 2020.
- GALE, N. V.; SACKETT, T. E.; THOMAS, S. C. Thermal treatment and leaching of biochar alleviates plant growth inhibition from mobile organic compounds. **Peer J**, [s.l.], v. 4, e2385, 2016.
- GASCÓ, G.; CELY, P.; PAZ-FERREIRO, J.; PLAZA, C.; MÉNDEZ, A. Relation between biochar properties and effects on seed germination and plant development. **Biological Agriculture & Horticulture**, [s.l.], v. 32, p. 237–247. 2016.
- GEILFUS, C.-M. Effect of Germination Substrates on Tomato Plants. **Controlled Environment Horticulture**, [s.l.], p. 215-223, 2019.
- GEZAHEGN, S.; SAIN, M.; THOMAS, S. C. Phytotoxic condensed organic compounds are common in fast but not slow pyrolysis biochars. **Bioresource Technology Reports**, [s.l.], v. 13, p. 100613, 2021.
- GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. AMELIORATING physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—a review. **Biol Fertil Soils**, [s.l.], v. 35, p. 219–230, 2002.
- GÓMEZ-ZORITA, S.; GONZÁLEZ-ARCEO, M.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; ESEBERRI, I.; TREPIANA, J.; PORTILLO, M. P. Scientific Evidence Supporting the Beneficial Effects of Isoflavones on Human Health. **Nutrients**. [s.l.], v. 12, n. 12, 3853, 2020.
- GONG, L.; TIAN, B.; LI, Y.; WU, S. Phenological Changes of Soybean in Response to Climate Conditions in Frigid Region in China over the Past Decades. **International Journal of Plant Production**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 363-375, 2021.
- GRUTZMACHER, P.; PUGA, A. P.; BIBAR, M. P. S.; COSCIONE, A. R.; PACKER, A. P.; ANDRADE, C. A. Carbon stability and mitigation of fertilizer induced N₂O emissions in soil

amended with biochar. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 625, p. 1459-1466, 2018.

GUJRE, N.; SONI, A.; RANGAN, L.; TSANG, D. C. W.; MITRA, S. Sustainable improvement of soil health utilizing biochar and arbuscular mycorrhizal fungi: A review. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 268, part B, 115549, 2021.

HAGEMANN, N.; SPOKAS, K.; SCHMIDT, H. P. et al. Activated Carbon, Biochar and Charcoal: Linkages and Synergies across Pyrogenic Carbon's ABCs. **Water**, [s.l.], v. 10: n. 182, 2018.

HASNAIN, M. et al. Biochar-plant interaction and detoxification strategies under abiotic stresses for achieving agricultural resilience: A critical review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 249, 114408, 2023.

HU, B.; YANG, C.; IQBAL, N.; DENG, J.; ZHANG, J.; YANG, W.; LIU, J. Development and validation of a GC–MS method for soybean organ-specific metabolomics. **Plant Production Science**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 215–224, 2018.

HU, W.; DI, Q.; LIANG, T.; LIU, J.; ZHANG, J. Effects of spent mushroom substrate biochar on growth of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Environmental Technology & Innovation**, [s.l.], v. 28, p. 102729, 2022.

IACOBAZZI, V.; INFANTINO, V. Citrate – new functions for an old metabolite. **Biological Chemistry**, [s.l.], v. 395, no. 4, p. 387–399, 17 Jan. 2014.

IHSANULLAH, I.; KHAN, M. T.; ZUBAIR, M.; BILAL, M.; SAJID, M. Removal of pharmaceuticals from water using sewage sludge-derived biochar: A review. **Chemosphere**, [s.l.], v. 289, 133196, 2022.

IWUOZOR, K. O.; EMENIKE, E. C.; IGHALO, J. O.; OMOARUKHE, F. O.; OMUKU, P. E.; ADENIYI, A. G. A Review on the thermochemical conversion of sugarcane bagasse into biochar. **Cleaner Materials**, [s.l.], v. 6, 100162, 2022.

JOPPERT, C. L.; DOS SANTOS, M. M.; COSTA, H. K. M. et al. Energetic shift of sugarcane bagasse using biogas produced from sugarcane vinasse in Brazilian ethanol plants. **Biomass and Bioenergy**, [s.l.], v. 107: p. 63–73, 2017.

JOSEPH, S.; COWIE, A. L.; VAN ZWIETEN, L.; BOLAN, N.; BUDAI, A.; BUSS, W.; CAYUELA, M. L.; GRABER, E. R.; IPPOLITO, J. A.; KUZYAKOV, Y.; LUO, Y.; OK, Y. S.; PALANSOORIYA, K. N.; SHEPHERD, J.; STEPHENS, S.; WENG, Z. (Han); LEHMANN, J. How biochar works, and when it doesn't: A review of mechanisms controlling soil and plant responses to biochar. **GCB Bioenergy**, [s.l.], v. 13, n. 11, p. 1731–1764, 2021.

JUMRANI, K.; BHATIA, V. S. Identification of drought tolerant genotypes using physiological traits in soybean. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 697–711, 2019.

KIM, E.-H., KIM, S.-L., KIM, S.-H.; CHUNG, I.-M. Comparison of Isoflavones and Anthocyanins in Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Seeds of Different Planting Dates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 41, p. 10196–10202, 2012.

KIM, H. S. Effect of different planting times on the quantitative variation of total seed isoflavone content and composition in Korean soybean cultivars (*Glycine max* (L.) Merr.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 24, p. 179–19, 2021.

LEBRE, D. T.; THIPE, V. C.; COTRIM, M. E. B.; BUSTILLOS, J. O. V. Use of Sugar Cane Bagasse as Solid Extraction Phase Sorbent to Analyze Hormones from Industrial Effluent. **ACS Omega**. [s.l.], v. 7, n. 12, p. 10069-10076, 2022.

LEE, J.-S.; KIM, H.-S.; HWANG, T-Y. Variation in Protein and Isoflavone Contents of Collected Domestic and Foreign Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Germplasms in Korea. **Agriculture**, [s.l.], v. 11, n. 735, 2021.

LEI, G.; HUANG, Y. Application progress of metabolomics in rice research. **Chinese Journal of Journal of Agricultural Science and Technology**, [s.l.], v. 19, n. 7, p. 27-35, 2017.

LEROY, C.; PETITCLERC, F.; ORIVEL, J.; CORBARA, B.; CARRIAS, J.-F.; DEJEAN, A.; CÉRÉGHINO, R. The influence of light, substrate and seed origin on the germination and establishment of an ant-garden bromeliad. **Plant Biology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 70-78, 2016.

LI, Y.; SHEN, F.; GUO, H. et al. Phytotoxicity assessment on corn stover biochar, derived from fast pyrolysis, based on seed germination, early growth, and potential plant cell damage. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 22, p. 9534–9543, 2015.

LI, Y.; SHEN, F.; GUO, H.; WANG, Z.; YANG, G.; WANG, L.; ZHANG, Y.; ZENG, Y.; DENG, S. Phytotoxicity assessment on corn stover biochar, derived from fast pyrolysis, based on seed germination, early growth, and potential plant cell damage. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 12, p. 9534–9543, 2015.

LIAO, N.; LI, Q.; ZHANG, W.; ZHOU, G.; MA, L.; MIN, W.; YE, J.; HOU, Z. Effects of biochar on soil microbial community composition and activity in drip-irrigated desert soil. **European Journal of Soil Biology**, [s.l.], v. 72, p. 27–34, 2016.

LINK, H. *et al.* Real-time metabolome profiling of the metabolic switch between starvation and growth. **Nature Methods**, [s.l.], v. 12, p. 1091-1097, 2015.

LIU, H.; MICIC, N.; MILLER, S.; CROCOLL, C.; BJARNHOLT, N. Species-specific dynamics of specialized metabolism in germinating sorghum grain revealed by temporal and tissue-resolved transcriptomics and metabolomics. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 196, p. 807–820, 2023.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: A primer. **Trends in Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 42, n. 4, 2017.

MA, J.; QUAN, G.; YAN, J.; IPPOLITO, J. A.; CUI, *et al.* Biochar extract compounds alter germination and growth of crop seed. **BioResources**, [s.l.], v. 17, p. 4151-4166, 2022a.

MA, Y.; WANG, P.; GU, Z.; SUN, M.; YANG, R. Effects of germination on physio-biochemical metabolism and phenolic acids of soybean seeds. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 112, p. 104717, 2022b.

MADSEN, M. D.; HULET, A.; PHILLIPS, K.; STALEY, J. L.; DAVIES, K. W.; SVEJCAR, T. J. Extruded seed pellets: A novel approach for enhancing sagebrush seedling emergence. **Native Plants Journal**, [s.l.], v. 17, p. 230-243, 2016.

MAETENS, E.; HETTIARACHCHY, N.; DEWETTINCK, K.; HORAX, R.; MOENS, K.; MOSELEY, D. O. Physicochemical and nutritional properties of a healthy snack chip developed from germinated soybeans. **LWT**, [s.l.], v. 84, p. 505–510, 2017.

MAFTU'AH, E.; SUSILAWATI, A.; LESTARI, Y.; KAROLINOERITA, V.; MUKHLIS, M.; SULAEMAN, Y. Application of bio and NPK fertilizer to improve yield soybean and acid sulfate soil properties in Indonesia. **Chilean journal of agricultural research**, [s.l.], v. 83, n. 1, p. 52–62, 2023.

MAHMUD, M. A.; ANANNYA, F. R. Sugarcane bagasse - A source of cellulosic fiber for diverse applications. **Heliyon**, [s.l.], v. 7, n. 8, e07771, 2021.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, Piracicaba, São Paulo, 1997. 319 p.

MANOHARLAL, R.; SAIPRASAD, G. V. S. Assessment of germination, phytochemicals, and transcriptional responses to ethephon priming in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Genome**, [s.l.], v. 62, n. 12, p. 769-783, 2019.

MANZONI, S.; JACKSON, R. B.; TROFYMOW, J. A.; PORPORATO, A. The global stoichiometry of litter nitrogen mineralisation. **Science**, [s.l.], v. 321, p. 684–686, 2008.

MAROUŠEK, J.; VOCHOZKA, M.; PLACHÝ, J.; ŽÁK, J. Glory and misery of biochar. **Clean Technologies and Environmental Policy**, [s.l.], n. 19, p. 311–317, 2017.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, Á.; ANDRÉS, M. F.; BARÓN-SOLA, Á.; DÍAZ-MANZANO, F. E.; YOUSEF, I.; MENA, I. F.; DÍAZ, E.; GÓMEZ-TORRES, Ó.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; HERNÁNDEZ, L. E.; ESCOBAR, C. Biochar from grape pomace, a waste of vitivinicultural origin, is effective for root-knot nematode control. **Biochar**, [s.l.], v. 5, n. 1, 2023.

MARTINEZ-HERNANDEZ, E.; AMEZCUA-ALLIERI, M. A., J.; ANELL, J. A. A. Sugarcane Bagasse Valorization Strategies for Bioethanol and Energy Production. **InTech EBooks**. Chemistry. 2017.

MARTINEZ-HERNANDEZ, E. *et al.* Current Scenario of Adsorbent Materials Used in Ethylene Scavenging Systems to Extend Fruit and Vegetable Postharvest Life. **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 11, p. 511-525, 2018.

MCKENNA, A. M.; CHACÓN-PATIÑO, M. L.; CHEN, H. *et al.* Expanding the Analytical Window for Biochar Speciation: Molecular Comparison of Solvent Extraction and Water-Soluble Fractions of Biochar by FT-ICR Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 93, n. 46, p. 15365-15372, 2021.

MESSINA, M. Soy and health update: Evaluation of the clinical and epidemiologic literature. **Nutrients**, [s.l.], v. 8, n.12, 754, 2016.

MUREŞAN, L.; CLAPA, D.; BORSAL, O.; RUSU, T.; WANG, T. T. Y.; PARK, J. B. Potential Impacts of Soil Tillage System on Isoflavone Concentration of Soybean as Functional Food Ingredients. **Land**, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 386, 2020.

MURTAZA, G.; AHMED, Z.; ELDIN, S. M.; ALI, B.; BAWAZEER, S.; USMAN, M.; IQBAL, R.; NEUPANE, D.; ULLAH, A.; KHAN, A.; HASSAN, M. U.; ALI, I.; TARIQ, A. Biochar-Soil-Plant interactions: A cross talk for sustainable agriculture under changing climate. **Frontiers in Environmental Science**, [s.l.], v. 11, p. 1-31, 2023.

NASIELSKI, J.; FURZE, J. R.; TAN, J.; BARGAZ, A.; THEVATHASAN, N. V.; ISAAC, M. E. Agroforestry promotes soybean yield stability and N₂-fixation under water stress. **Agronomy for Sustainable Development**, [s.l.], v. 35, n. 4, p. 1541–1549, 2015.

NAUTIYAL, P. C.; SIVASUBRAMANIAM, K.; DADLANI, M. Seed Dormancy and Regulation of Germination. **Seed Science and Technology**, Singapore, p. 39-66, 2023.

NOSTER, J.; PERSICKE, M.; CHAO, T.-C.; KRONE, L.; HEPPNER, B.; HENSEL, M.; HANSMEIER, N. Impact of ROS-Induced Damage of TCA Cycle Enzymes on Metabolism and Virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Frontiers in Microbiology**, [Ss.l.], v. 10, 2019.

OGAWA, M. Symbiosis of people and nature in the tropics. **Farming Japan**, v. 28, p. 10-34, 1994.

OH, T. K.; SHINOGLI, Y.; CHIKUSHI, J.; LEE, Y. H.; CHOI, B. S. Effect of aqueous extract of biochar on germination and seedling growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 55-60, 2012.

OLMO, M.; VILLAR, R.; SALAZAR, P.; ALBURQUERQUE, J. A. Changes in soil nutrient availability explain biochar's impact on wheat root development. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 399, n. 1–2, p. 333–343, 2015.

OLSZYK, D. M.; SHIROYAMA, T.; NOVAK, J. M.; JOHNSON, M. G. A rapid-test for screening biochar effects on seed germination. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s.l.], v. 49, n. 16, 2018.

PANG, Z.; ZHOU, G.; EWALD, J.; CHANG, L.; HACARIZ, O.; BASU, N.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 17, p. 1735–1761, 2022.

QIU, B.; TAO, X.; WANG, H.; LI, W.; DING, X.; CHU, H. Biochar as a low-cost adsorbent for aqueous heavy metal removal: A review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [s.l.], v. 155, 2021.

RACIOPPI, M.; TARTAGLIA, M.; DE LA ROSA, J. M.; MARRA, M.; LOPEZ-CAPEL, E.; ROCCO, M. Response of Ancient and Modern Wheat Varieties to Biochar Application: Effect on Hormone and Gene Expression Involved in Germination and Growth. **Agronomy**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 5, 18 Dec. 2019.

RAMDATH, D. D.; PADHI, E. M. T.; SARFARAZ, S.; RENWICK, S.; DUNCAN, A. M. Beyond the cholesterol-lowering effect of soy protein: A review of the effects of dietary soy and its constituents on risk factors for cardiovascular disease. **Nutrients**, [s.l.], v. 9, 324, 2017.

RAMÍREZ-TOBÍAS, H. M.; PEÑA-VALDIVIA, C. B.; TREJO, C.; AGUIRRE R, J. R.; VAQUERA H, H. Seed germination of Agave species as influenced by substrate water potential. **Biological Research**, [s.l.], v. 47, n. 1, 2014.

RATHNAYAKE, D.; CREBER, H.; VAN POUCKE, R.; SOHI, S.; MEERS, E.; MAŠEK, O.; RONSSE, F. Biochar from sawmill residues: characterization and evaluation for its potential use in the horticultural growing media. **Biochar**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 201-212, 2021.

RAVINDRAN, B.; MUPAMBWA, H. A.; SILWANA, S.; MNKENI, P. N. S. Assessment of nutrient quality, heavy metals and phytotoxic properties of chicken manure on selected commercial vegetable crops. **Heliyon**, [s.l.], v. 3, n. 12, e00493, 2017.

RAVINDRAN, B.; NGUYEN, D. D.; CHAUDHARY, D. K.; CHANG, S. W.; KIM, J.; LEE, S. R.; SHIN, J. D.; JEON, B. H.; CHUNG, S. J.; LEE, J. J. Influence of nanobiochar on physico-chemical and microbial community during swine manure composting process. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 232, p. 592-59, 2019.

RAVINDRAN, B.; NGUYEN, D. D.; CHAUDHARY, D. K.; CHANG, S. W.; KIM, J.; LEE, S. R.; SHIN, J.; JEON, B.-H.; CHUNG, S.; LEE, J. Influence of biochar on physico-chemical and microbial community during swine manure composting process. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 232, p. 592–599, 2019.

RESENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology Biofuels**, [s.l.], v. 4, n. 54, 2011.

REYES-CABRERA, J.; ERICKSON, J. E.; LEON, R. G. Biochar affects soil water content but not soybean yield in a sandy southeastern U.S. soil. **Agrosystems, Geosciences & Environment**. [s.l.], e20197, 2021.

ROCHA, D. K.; CARVALHO, E. R.; PIRES, R. M. de O.; SANTOS, H. O. dos; PENIDO, A. C.; ANDRADE, D. B. de. Does the substrate affect the germination of soybean seeds treated with phytosanitary products? **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 44, e020119, 2020.

ROGOVSKA, N.; LAIRD, D.; CRUSE, R. M.; TRABUE, S.; HEATON, E. Germination Tests for Assessing Biochar Quality. **Journal of Environmental Quality**, [s.l.], v. 41, n. 4, p. 1014-1022, 2012.

SCHENCK, C. A.; MAEDA, H. A. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. **Phytochemistry**, [S.I.], v. 149, p. 82–102, May 2018.

SEIXAS, F.; GIMENES, M. L.; FERNANDES-MACHADO, N. R. C. Treatment of vinasse by adsorption on carbon from sugar cane bagasse. **Química Nova**, [S.I.], v. 39, n. 2, 2016.

SHARHOLY, M.; *et al.*, Municipal solid waste management in Indian cities – A review. **Waste Management**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 459, 2008.

SILVA, M. P.; NIEVA-LOBOS, M. L.; PILONI, R. V. et al. Pyrolytic biochars from sunflower seed shells, peanut shells, and *Spirulina* algae: their potential as soil amendment and natural growth regulators. **SN Applied Sciences**. [s.l.], v. 2, 1926, 2020a.

SILVA, R. F. B.; BATISTELLA, M.; MORAN, E.; CELIDONIO, O. L. M.; MILINGTON, J. D. A. The Soybean Trap: Challenges and Risks for Brazilian Producers. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [s.l.], v. 4, 2020b.

SILVA, R. F. B.; VIÑA, A.; MORAN, E. F.; DOU, Y.; BATISTELLA, M.; LIU, J. Socioeconomic and environmental effects of soybean production in metacoupled systems. **Scientific reports**, v. 11, 18662, 2021.

SINGH, S. K.; REDDY, V. R.; FLEISHER, D. H.; TIMLIN, D. J. Phosphorus Nutrition Affects Temperature Response of Soybean Growth and Canopy Photosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 9, 2018.

SOLAIMAN, Z. M.; MURPHY, D. V.; ABBOTT, L. K. Biochars influence seed germination and early growth of seedlings. **Plant Soil**, [s.l.], v. 353, p. 273-287, 2012.

SONG, S.; ARORA, S.; LASERNA, A. K. C.; SHEN, Y.; THIAN, B. W. Y.; CHEONG, J. C.; TAN, J. K. N.; CHIAM, Z.; FONG, S. L.; GHOSH, S.; OK, Y. S.; LI, S. F. Y.; TAN, H. T. W.; DAI, Y.; WANG, C.-H. Biochar for urban agriculture: Impacts on soil chemical characteristics and on Brassica rapa growth, nutrient content and metabolism over multiple growth cycles. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 727, p. 138742, 2020.

SOUZA, L. Z. M. de; PINTO, B. C.; ALVES, A. B.; RIBEIRO, A. V. de O.; FELICIANO, D. C. T.; SILVA, L. H. da; DIAS, T. T. M.; YILMAZ, M.; OLIVEIRA, M. A. de; BEZERRA, A. C. da S.; FERREIRA, O. E.; LIMA, R. P. de; PIMENTA, L. P. do S.; MACHADO, A. R. T. Ecotoxicological Effects of Biochar Obtained from Spent Coffee Grounds. **Materials Research**, [s.l.], v. 25, suppl. 2, 2022.

SRI-SHALINI, S.; PALANIVELU, K.; RAMACHANDRAN, A.; RAGHAVAN, V. Biochar from biomass waste as a renewable carbon material for climate change mitigation in reducing greenhouse gas emissions - a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s.l.], v. 11: p. 2247-2267, 2020.

STEINER, C.; DAS, K. C.; GARCIA, M.; FÖRSTER, B.; ZECH, W. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. **Pedobiologia**, [s.l.], v. 51, p. 359–366, 2008.

SUN, C. X.; CHEN, X.; CAO, M. M.; LI, M. Q.; ZHANG, Y. L. Growth and metabolic responses of maize roots to straw biochar application at different rates. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 416, n. 1-2, p. 487-502, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TIQUIA, S. M. Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig-on-litter system. In: P.R. Warman and B.R. Taylor, Ed., **Proceedings of the Inter. Composting Symposium**, CBA Press Inc., Truro, N. S. p. 625-647, 2000

TRAZZI, P. A.; HIGA, A. R.; DIECKOW, J.; MANGRICH, A. S.; HIGA, R. C. V. Biocarvão: realidade e potencial de uso no meio florestal. **Ciências Florestais**, [s.l.], v. 28, n. 2, 2018.

TRIPATHI, M.; SAHU, J. N.; GANESAN, P. Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 467-481, 2016.

TUAN, P. A.; SUN, M.; NGUYEN, T.-N.; PARK, S.; AYELE, B. T. Molecular mechanisms of seed germination. **Sprouted Grains**, [s.l.], p. 1-24, 2019.

VITAL, R. G.; MÜLLER, C.; FREIRE, F. B. S.; SILVA, F. B.; BATISTA, P. F.; FUENTES, D.; RODRIGUES, A. A.; MOURA, L. M. F.; DALOSO, D. M.; SILVA, A. A.; MERCHANT, A.; COSTA, A. C. Metabolic, physiological and anatomical responses of soybean plants under water deficit and high temperature condition. **Scientific Reports**, [s.l.], Molecular mechanisms of seed germination v. 12, n. 1, 1 2022.

VOLF, M. R.; BATISTA-SILVA, W.; SILVÉRIO, A. D.; DOS SANTOS, L. G.; TIRITAN, C. S. Effect of potassium fertilization in sandy soil on the content of essential nutrients in soybean leaves. **Annals of Agricultural Sciences**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 99-106, 2022.

WAQAS, M.; KIM, Y. H.; KHAN, A. L.; SHAHZAD, R.; ASAF, S.; HAMAYUN, M.; KANG, S. M.; KHAN, M. A.; LEE, I. J. Additive effects due to biochar and endophyte application enable soybean to enhance nutrient uptake and modulate nutritional parameters. **Journal of Zhejiang University: Science B**. [s.l.], v. 18, n. 2, p. 109-124, 2017.

WENG, Z.; VAN ZWIETEN, L.; SINGH, B. P.; KIMBER, S.; MORRIS, S.; COWIE, A.; MACDONALD, L. M. Plant-biochar interactions drive the negative priming of soil organic

carbon in an annual ryegrass field system. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 90, p. 111-121, 2015.

WU, Y.; WANG, X.; ZHANG, L.; ZHENG, Y.; LIU, X.; ZHANG, Y. The critical role of biochar to mitigate the adverse impacts of drought and salinity stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 14, 2023.

XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 6, p.743-760, 2011

XIA, L.; CHEN, W.; LU, B.; WANG, S.; et al. Climate mitigation potential of sustainable biochar production in China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 175, 113145, 2023,

XU, Q.; JI, T.; GAO, S. J.; YANG, Z.; WU, N. Characteristics and Applications of Sugar Cane Bagasse Ash Waste in Cementitious Materials. **Materials (Basel)**, [s.l.], v. 12, n. 1, 39, 2018.

XU, H.; CAI, A.; WU, D.; LIANG, G.; XIAO, J.; XU, M.; COLINET, G.; ZHANG, W. Effects of biochar application on crop productivity, soil carbon sequestration, and global warming potential controlled by biochar C:N ratio and soil pH: A global meta-analysis. **Soil and Tillage Research**, [s.l.], v. 213, 105125, 2021.

YANG, L.; BI, L.; JIN, L.; WANG, Y.; LI, Y.; LI, Z.; HE, W.; CUI, H.; MIAO, J.; WANG, L. Geniposide Ameliorates Liver Fibrosis Through Reducing Oxidative Stress and Inflammatory Respose, Inhibiting Apoptosis and Modulating Overall Metabolism. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l.], v. 12, 2021.

YANG, X.; MENG, J.; LAN, Y.; CHEN, W.; YANG, T.; YUAN, J.; LIU, S.; HAN, J.; Effects of maize stover and its biochar on soil CO₂ emissions and labile organic carbon fractions in Northeast China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], n. 240, p. 24-31, 2017.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; IDA, E. I. Multistep optimization of β -glucoside extraction from germinated soybeans (*Glycine max* L. Merrill) and recovery of isoflavones aglycones. **Foods**, [s.l.], v. 7, n. 110, 2018.

YOU, S.; LI, W.; ZHANG, W.; LIM, H.; KUA, H. W.; PARK Y-K.; IGAVITHANA, A. D.; OK, Y. S. Energy, economic, and environmental impacts of sustainable biochar systems in rural China. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 52, n. 7, 2022.

ZEIDABADI, Z. A.; BAKHTIARI, S.; ABBASLOU, H.; GHANIZADEH, A. R. Synthesis, characterization and evaluation of biochar from agricultural waste biomass for use in building materials. **Construction and Building Materials**, [s.l.], v. 181, p. 301-308, 2018.

ZHANG, K.; WANG, Y.; MAO, J.; CHEN, B. Effects of biochar nanoparticles on seed germination and seedling growth. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 256, p. 113409, 2020.

ZHU, Q.; KONG, L.; XIE, F.; ZHANG, H.; WANG, H.; AO, X. Effects of biochar on seedling root growth of soybeans. **Chilean journal of agricultural research**, [s.l.], v. 78, n. 4, p. 549–558, 2018.